

Paula Cristina Engler Ribeiro

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE OXIDATIVA DE  
MARGARINAS ADICIONADAS DE EXTRATOS DE CASCA DE  
NOZ-PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] E DE  
ALECRIM [*Rosmarinus Officinalis*]**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos, da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau  
de Mestre em Ciência dos  
Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Jane  
Mara Block

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Engler Ribeiro, Paula Cristina

Avaliação da qualidade oxidativa de margarinas  
adicionadas de extratos de casca de noz-pecã [*Carya*  
*illinoensis* (Wangerh) C. Koch] e de alecrim [*Rosmarinus*  
*Officinalis*] / Paula Cristina Engler Ribeiro ;  
orientadora, Jane Mara Block - Florianópolis, SC, 2013.  
108 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Noz-pecã. 3. Oxidação  
margarinas. 4. Antioxidantes naturais. I. Block, Jane Mara  
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Paula Cristina Engler Ribeiro

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE OXIDATIVA DE  
MARGARINAS ADICIONADAS DE EXTRATOS DE CASCA DE  
NOZ-PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] E DE  
ALECRIM [*Rosmarinus Officinallis*]**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de dezembro de 2013.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roseane Fett  
Coordenadora do Curso de Pós Graduação em Ciência dos  
Alimentos – UFSC

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jane Mara Block  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Regina Salvador Ferreira  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edna Regina Amante  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

---

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC



*Ao meu marido, Davy, meus pais Edson e Renate, a minha irmã  
Joana, dedico.*



## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio em todos os momentos. Davy, pai, mãe, Joana, obrigada por tudo.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Alimentos pelo aprendizado e oportunidade.

À professora Jane Mara Block pela dedicação, confiança e amizade.

À todos do laboratório de óleos e gorduras, Giselle, Ana Cristina, Ana Claudia, Rafael, Priscila Santos, Rossana, Bruna Mattioni, e principalmente a Priscila Policarpi pelo auxílio nas análises e a Vanessa Hissanaga pela amizade conquistada.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À empresa Bunge pelo fornecimento das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

E à todos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

Muito obrigada!





## RESUMO

Várias pesquisas indicam efeitos indesejáveis sobre a saúde causados pela adição de antioxidantes sintéticos em alimentos. Desta forma existe um interesse crescente pelo uso de antioxidantes de origem natural. Neste trabalho foi estudado o efeito da adição de antioxidantes naturais (extrato de casca de noz-pecã e extrato de alecrim) e antioxidantes sintéticos (BHT) sobre a estabilidade oxidativa de margarinas. Nas margarinas com teor de gordura de 60% foram adicionados 1000 ppm e 1500 ppm de extrato de casca de noz-pecã; 1000 ppm de extrato comercial de alecrim, e 100 ppm de BHT. As margarinas foram armazenadas a 4 °C por 8 meses e caracterizadas de acordo com o índice de peróxido, índice de *p*-anisidina, extinção específica (dienos e trienos conjugados), umidade, índice de acidez, ponto de fusão e perfil de ácidos graxos. No extrato de casca de noz-pecã e de alecrim foram determinados os teores de compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante (métodos ABTS e DPPH). Nas margarinas estudadas, análises de índice de peróxido, índice de *p*-anisidina, valor Totox, extinção específica e cor foram realizadas mensalmente. O perfil de ácidos graxos foi determinado no início e no fim do experimento. De acordo com os resultados obtidos para todas as amostras estudadas, ocorreu aumento no índice de peróxido, valor Totox e trienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ). A partir do quinto mês de armazenamento observou-se uma tendência para a redução no índice de *p*-anisidina. O parâmetro de cor  $a^*$  externa aumentou significativamente ao longo do tempo de armazenamento, enquanto a cor  $L^*$  externa e a cor  $a^*$  interna mostraram uma redução. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, indicando que os extratos de noz-pecã podem ser utilizados neste tipo de aplicação, como um antioxidante natural.

**Palavras-chave:** casca de noz-pecã, alecrim, BHT, atividade antioxidante, oxidação, margarina.



## ABSTRACT

Several studies indicate possible undesirable effects on human health caused by synthetic antioxidants added in foods. As a result has been an increasing interest in the use of antioxidants obtained from natural sources. In this work the effect of the addition of natural (pecan nut shell extract and rosemary extract) and synthetic antioxidants (BHT) on oxidative stability in margarines was studied. 1000 ppm and 1500 ppm of pecan nut shell extract, 1000 ppm of a commercial rosemary extract, and 100 ppm of BHT were added in margarines with a fat content of 60%. The margarines were stored at 4°C for 8 months and characterized according to the peroxide and *p*-anisidine value, Totox value, specific extinction (conjugated dienes and trienes), moisture and volatile matter, acid value, melting point and fatty acid profile. In pecan nut shell and rosemary extract the total phenolic compound content, condensed tannin content and antioxidant activity (ABTS and DPPH methods) were determined. In the studied margarines analysis of peroxide and *p*-anisidine value, Totox value, specific extinction, and color were performed monthly. The fatty acid profile was performed at the beginning and at the end of the experiment. The results for all samples showed a significant increase in the peroxide value, Totox value and conjugated trienes over the storage time ( $p < 0.05$ ). From the fifth month of storage a tendency to a reduction in anisidine value was observed. The external color parameter  $a^*$  increased significantly over storage time, while external color  $L^*$  and internal color  $a^*$  showed a decrease. The results showed that there was no significant difference between different treatments indicating that the pecan nut extracts may be used in this kind of application as a natural antioxidant.

**Keywords:** pecan nut shell, rosemary, BHT, antioxidant activity, oxidation, margarine.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 Esquema representativo da oxidação do ácido linoleico pela lipoxigenase.....	25
Figura 2 Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica.....	27
Figura 3 Mecanismo de um antioxidante primário, simbolizado por AH. .....	29
Figura 4 Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos. ....	30
Figura 5 Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis. ....	32
Figura 6 Tipos de emulsão, óleo em água e água em óleo. ....	37
Figura 7 Princípios da estabilização de emulsões. ....	38
Figura 8 Diferentes processos que podem levar ao colapso de emulsões. .....	40
Figura 9 Representação estrutural dos emulsificantes lipofílicos e hidrofílicos. ....	45
Figura 10 Etapas gerais de produção de margarinas. ....	48
Figura 11 Determinação iodométrica de peróxido. ....	53

### CAPÍTULO 2

Figura 1 Evolução do índice de peróxido, mEq/kg, nas margarinas estudadas, em função do tempo e do antioxidante adicionado.....	87
Figura 2 Evolução do índice de <i>p</i> -anisidina das margarinas estudadas em função do tempo e do antioxidante utilizado.....	88
Figura 3 Evolução do valor Totox, em função do tempo e do antioxidante utilizado. ....	90
Figura 4 Evolução do índice de dienos, em função do tempo e do antioxidante utilizado. ....	91
Figura 5 Evolução do índice de trienos, em função do tempo e do antioxidante utilizado. ....	91
Figura 6 Evolução dos valores dos parâmetros de cor a* (A), b* (B), L* (C) obtidos da parte externa das margarinas ao longo do tempo.....	93
Figura 7 Evolução dos valores dos parâmetros de cor interna a* (A), b* (B), L* (C), obtidos da parte interna das margarinas, em função do tempo.....	95

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 Extrato seco (ES), compostos fenólicos totais (FT), taninos condensados (TC) e capacidade antioxidante (CA) <i>in vitro</i> do extrato obtido por infusão da casca de noz-pecã e extrato comercial de alecrim. ....	78
Tabela 2 Valores de fenólicos totais em diferentes extratos de alecrim	80
Tabela 3 Parâmetros de identidade e qualidade das margarinas estudadas.....	81
Tabela 4 Avaliação da qualidade das margarinas adicionadas dos extratos durante o período de armazenamento.....	84
Tabela 5 Perfil de ácidos graxos das margarinas estudadas após 8 meses de armazenamento. ....	98

## SUMÁRIO

1 Introdução .....	17
2 Objetivos .....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	21
1 Revisão Bibliográfica.....	23
1.1 Lipídios .....	23
1.2 Reações de deterioração em lipídios .....	23
1.2.1 Rancidez oxidativa .....	25
1.2.1.1 Reações enzimáticas.....	25
1.2.1.2 Autooxidação .....	26
1.2.1.3 Fotooxidação .....	27
1.3 Antioxidantes .....	28
1.3.1 Antioxidantes sintéticos .....	30
1.3.2 Antioxidantes naturais.....	31
1.3.2.1 Extrato de alecrim .....	33
1.3.2.2 Extrato de noz-pecã [ <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch].....	35
1.4 Sistemas lipídicos.....	36
1.5 Margarinas .....	40
1.5.1 Antioxidantes, emulsificantes e aditivos em margarinas .....	43
1.5.2 Etapas de produção.....	48
1.6 Métodos para avaliação da oxidação.....	51
1.6.1 Índice de estabilidade de óleos - Osi ( <i>Oil Stability Index</i> ) .....	51
1.6.2 Índice de <i>p</i> -Anisidina .....	52
1.6.3 Índice de peróxidos .....	52
1.6.4 Valor Totox .....	53
1.6.5 Dienos e trienos.....	53
1.6.6 Perfil de ácidos graxos .....	54
1.7 Outros métodos para avaliação da qualidade de margarinas .....	54
1.7.1 Índice de acidez.....	54
1.7.2 Ponto de fusão .....	54
1.7.3 Análise de cor.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	70
1 Introdução .....	72
2 Material e Métodos .....	73
2.1 Material.....	73
2.1.1 Margarinas.....	73

2.1.2 Extrato de casca de noz-pecã e antioxidantes comerciais .....	73
2.2 Métodos .....	74
2.2.1 Determinação dos compostos fenólicos totais e taninos condensados no extrato de noz-pecã e extrato comercial de alecrim....	74
2.2.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato de casca de noz-pecã e do extrato comercial de alecrim .....	75
2.2.2.1 Método ABTS .....	75
2.2.2.2 Método DPPH .....	75
2.2.3 Procedimento experimental para adição dos antioxidantes nas margarinas e preparação das mesmas antes das análises .....	76
2.2.4 Caracterização físico-química das margarinas .....	76
2.2.5 Avaliação da qualidade das margarinas durante estocagem .....	77
2.2.6 Análise microbiológica .....	77
2.2.7 Análise estatística .....	77
3 Resultados e Discussão .....	78
3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante in vitro do extrato da casca de noz-pecã e do extrato comercial de alecrim .....	78
3.2 Caracterização inicial da margarina .....	81
3.3 Avaliação da qualidade das margarinas durante a estocagem .....	83
3.4 Análises Microbiológicas .....	99
4 Conclusões .....	99
Referências .....	100



## 1 Introdução

A oxidação lipídica produz mudanças indesejáveis na cor, sabor, odor, aroma e outros fatores de qualidade, tornando os alimentos impróprios para consumo. O valor nutricional do produto também é comprometido devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais e, a textura pode ser alterada como resultado de reações entre proteínas e produtos da oxidação lipídica (VALENZUELA; NIETO, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

A oxidação lipídica é influenciada por fatores como o tipo de alimento, sua composição em ácidos graxos, presença de pró ou antioxidantes, tipo de interface entre lipídios e oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou emulsão) e a exposição a luz e ao calor (FRANKEL et al., 1994). Nas emulsões, além dos fatores anteriormente citados, também devem ser considerados o tamanho das gotículas de gordura que, por estarem cercadas pelos emulsificantes, podem estar protegidas por essa barreira além do tipo de emulsificante utilizado (COUPLAND; MCCLEMENTS, 1996; WAHARO et al., 2011).

O desenvolvimento da oxidação pode ser retardado pelo uso de antioxidantes de origem sintética ou natural. Muitas pesquisas têm sido realizadas a respeito do uso de antioxidantes e os de origem sintética têm sido motivo de preocupação durante as duas últimas décadas devido ao relato sobre efeitos deletérios e potencialmente perigosos para a saúde. Sendo assim, os antioxidantes naturais podem representar uma alternativa ao uso dos antioxidantes sintéticos. Além disto, a substituição de antioxidantes sintéticos por naturais tem sido imposta pelos consumidores uma vez que os mesmos são considerados mais seguros (VALENZUELA; NIETO, 1996; KIOKIAS et al., 2009).

Em sistemas alimentícios com baixa razão superfície-volume (óleos vegetais), antioxidantes polares com alto balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), como propil galato (PG), TBHQ (tercbutilhidroquinona) e Trolox C, são mais efetivos que antioxidantes apolares lipofílicos, como BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e tocoferóis. Em contraste, alimentos com alta razão superfície-volume (como por exemplo, os óleos emulsificados), antioxidantes lipofílicos com baixo HLB são mais eficientes (PORTER et al., 1989). Este tipo de comportamento ficou conhecido como ‘paradoxo polar’, no qual antioxidantes polares são mais efetivos em lipídios não polares, enquanto antioxidantes não polares são mais ativos

em emulsões lipídicas polares (HOPIA et al., 1996; MOURE et al., 2001).

Uma emulsão é uma dispersão de um líquido em outro, onde cada líquido é imiscível ou fracamente miscível (usualmente óleo e água). As emulsões são obtidas por cisalhamento de fluidos imiscíveis até fragmentação de uma fase sobre a outra, formando gotículas pequenas e esféricas. Nos alimentos, o tamanho destas partículas geralmente é de 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ . Podem ser diluídas ou concentradas e exibem propriedades e dinâmicas internas diferentes. Emulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A), onde gotículas de óleo estão dispersas em água e água em óleo (A/O), onde gotículas de água encontram-se dispersas em óleo. Como o tipo da emulsão é determinado principalmente pela razão óleo e água, é possível obter uma inversão de fases alterando esta razão (VAN NIEUWENHUYZEN; SZUHAJ, 1998; MCCLEMENTS; DECKER, 2000; MCCLEMENTS, 2003; CAPEK, 2004).

A natureza da membrana interfacial formada por emulsificantes pode ter um grande impacto sobre a taxa de oxidação lipídica em emulsões, como as margarinas. Consequentemente os cientistas de alimentos podem melhorar a estabilidade oxidativa deste tipo de alimento através da manipulação interfacial e da utilização de diferentes emulsificantes (MCCLEMENT; DECKER, 2000). Os antioxidantes mais utilizados em margarinas são o BHT e o BHA, ou uma mistura de ambos (CHRYSAN, 2005). A adição de antioxidantes naturais também tem sido estudada em margarinas e emulsões, entre eles tocoferóis (AZIZKHANI; ZANDI, 2009, 2010; FILIP, 2009; AZIZKHANI et al., 2011), lecitina (AZIZKHANI; ZANDI, 2009, 2010), ácido ascórbico (FILIP, 2009), casca de amêndoa (*Prunus amygdalus*) (MOURE et al., 2007), orégano, sálvia e tomilho (ABDALLA; ROOZEN, 1999) e extrato de alecrim (FRANKEL et al., 1996; SAMOTYJA; MALECKA, 2007; GRAMZA-MICHALOWSKA et al., 2008; AZIZKHANI; ZANDI, 2009, 2010).

Vários estudos têm mostrado que as matérias primas vegetais com atividade antioxidante são ricas em compostos fenólicos, como exemplos podem ser citados: semente e casca de uva (SHAKER, 2006), alho (IQBAL e BHANGER, 2007), casca de romã (IQBAL et al., 2008), própolis (OZCAN, 2000) e noz-pecã (PRADO et al., 2009a, 2009b, 2009c).

No sul do Brasil, o processamento da noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] resulta em um volume aproximado de

40 a 50% de casca residual (WORLEY, 1994). A casca, que é comercializada para o preparo de chá, pode constituir uma fonte alternativa de compostos capazes de agir como antioxidantes devido a presença de compostos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido p-hidroxibenzóico, epigallocatequina e epicatequina galato (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007, PRADO et al., 2014).

Prado e colaboradores (2009a, 2009b, 2009c) reportam que infusões e extratos de casca de noz-pecã apresentam alto teor de fenólicos totais e taninos condensados, assim como elevada atividade antioxidante. Em outro estudo, micropartículas obtidas por *spray dryer* e contendo extratos de casca de noz-pecã foram adicionadas em óleo de soja e aumentaram a estabilidade oxidativa em relação ao índice de peróxidos (Prado et al., 2013). Estudos “in vivo” também demonstram as propriedades do extrato aquoso da casca de noz-pecã para prevenir o dano oxidativo induzido pela exposição à fumaça de cigarro e os efeitos deletérios do etanol no fígado indicando propriedades antioxidantes e hepatoprotetora em ratos (RECKZIEGEL et al., 2011; MÜLLER et al., 2013).

Tendo em vista os estudos anteriores e o potencial antioxidante apresentado pelos extratos e pela infusão da casca de noz-pecã, o presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade antioxidante destes extratos durante a vida de prateleira de margarinas armazenadas a 4°C, e comparar com um extrato comercial de alecrim e com o antioxidante sintético BHT.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade oxidativa de margarinas adicionadas de antioxidantes naturais (extrato aquoso de casca de noz-pecã e extrato comercial etanólico de alecrim) e de BHT estocadas a 4 °C durante 8 meses.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos da casca de noz-pecã (variedade Barton) através de infusão a quente (98/100 °C) e determinar o teor de fenólicos totais (método colorimétrico Folin-Ciocalteu), taninos condensados (método colorimétrico da Vanilina), e a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH;

- Produzir a margarina em planta piloto e caracterizar as mesmas através da determinação da composição em ácidos graxos por cromatografia a gás, OSI (*Oil Stability Index*), índice de peróxidos, índice de *p*-anisidina, extinção específica, índice de acidez, umidade e ponto de fusão;

- Determinar a qualidade oxidativa das margarinas adicionadas de 1000 e 1500 ppm de extrato de noz-pecã; 1000 ppm de extrato de alecrim e, 100 ppm de BHT, através da determinação do índice de peróxido, extinção específica, índice de anidisina e análise de cor pelo período de 8 meses;

- Determinar a qualidade microbiológica das margarinas estudadas através da análise de coliformes a 45°C.

## **CAPÍTULO 1**

### **Revisão bibliográfica**



## **1 Revisão Bibliográfica**

### **1.1 Lipídios**

Os lipídios são nutrientes importantes responsáveis pelo aporte de energia na dieta, exercem função na estrutura, composição e permeabilidade das membranas e paredes celulares e no isolamento e proteção dos órgãos internos do corpo. Além disso, possuem grande interesse econômico, como no caso do leite e das margarinas. Os lipídios abrangem um número muito vasto de substâncias e podem ser descritos como compostos encontrados nos organismos vivos, geralmente insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos. Todos os lipídios contêm carbono, hidrogênio e oxigênio, em algumas classes são encontrados fósforo, nitrogênio e às vezes, enxofre. São de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, de onde podem ser facilmente extraídos com solventes orgânicos (BOBBIO; BOBBIO, 1989; ORDONEZ et al., 2007).

Entre os lipídios estão os mono, di e triacilgliceróis, ácidos graxos, ceras, glicerofosfolipídios, fosfolipídios, esfingolipídios, cerebrosídeos, carotenóides, esteróides e vitaminas lipossolúveis (OETTERER et al., 2006).

Os lipídios mais amplamente distribuídos na natureza são os óleos e gorduras, constituídos de 97 a 99% de triglicerídios. Os triglicerídios são constituídos de uma molécula de glicerol esterificada com ácidos graxos. Os ácidos graxos são formados por cadeias carbônicas alifáticas com grupos carboxílicos terminais. Possuem de 4 a 22 carbonos (sendo mais comum com 18 carbonos), apresentam ligações saturadas e insaturadas e ocupam a maior parte da massa molecular do triglicerídio (SILVA, et al., 1999; COULTATE, 2004; SCRIMGEOUR, 2005; OETTERER et al., 2006; BLOCK; BARRERA-ARELLANO, 2013).

### **1.2 Reações de deterioração em lipídios**

As formas de deterioração de lipídios são a rancidez hidrolítica e oxidativa. A rancidez hidrolítica, muito comum durante o armazenamento de alimentos, é aquela na qual a fração lipídica presente é lentamente hidrolisada pela água à temperatura elevada ou por enzimas lipolíticas presentes nas sementes oleaginosas ou de origem microbiana em matérias primas ricas em ácidos graxos de cadeia curta

(ZAMORA et al., 1991; RAMALHO; JORGE, 2006; ORDÓNEZ et al., 2007). Tipicamente, ácidos graxos contendo de quatro a dez carbonos, conferem reversão do sabor em alimentos que resulta em desenvolvimento do sabor de sabão (COULTATE, 2004). A rancidez oxidativa pode ser definida como o processo de adição de oxigênio ou remoção de hidrogênio ou elétrons, nos ácidos graxos insaturados, levando a formação de radicais livres. A reação de oxidação pode ser acelerada pelo calor, luz (fotooxidação), ionização, traços de metais (cobre e ferro), metaloproteínas e pela enzima lipoxigenase (SILVA et al., 1999; COULTATE, 2004; REDA; CARNEIRO, 2007).

A oxidação lipídica produz mudanças indesejáveis na cor, sabor, odor, aroma e outros fatores de qualidade, tornando os alimentos impróprios para consumo e causa o sabor e odor de ranço que se desenvolve em óleos e gorduras oxidados. O valor nutricional do produto é comprometido, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais e a textura pode ser alterada como resultado de reações entre proteínas e produtos da oxidação lipídica (VALENZUELA; NIETO, 1996; ORDONEZ et al., 2007)

A formação de compostos de odor e sabor desagradáveis decorrentes da oxidação dos lipídios nos alimentos é favorecida por diversos fatores, entre eles o primordial, que é a presença de oxigênio (OETTERER et al., 2006). Os mecanismos de ação da oxidação dos ácidos graxos em alimentos são diversos e extremamente complexos e estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde o lipídio se encontra. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição a luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lipídios (FRANKEL et al., 1994).

O grupamento éster, formado entre a carboxila do ácido graxo e a hidroxila do glicerol ou de outro álcoois, pertencem a classe de relativa reatividade das moléculas lipídicas, hidrolisando-se em ácidos graxos livres na maioria das vezes (OETTERER et al., 2006). Durante os estágios iniciais do processo de oxidação, hidroperóxidos são acumulados como os produtos primários, que posteriormente se rompem para formar moléculas oxigenadas de baixa massa molecular, como álcoois, aldeídos, ácidos graxos livres e cetonas, levando ao ranço. O acúmulo de hidroperóxidos é frequentemente monitorado utilizando a medida do índice de peróxido. Este índice, dienos conjugados e o índice de acidez, o qual mede a rancidez, são os mais frequentes índices de



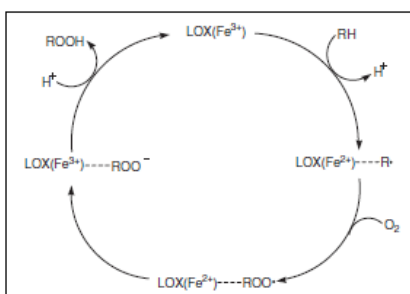
determinação de qualidade durante a produção, armazenamento e venda de óleos (FARHOOSH et al., 2009; AL-BANDAK et al., 2011).

## 1.2.1 Rancidez oxidativa

### 1.2.1.1 Reações enzimáticas

A oxidação lipídica pode ser catalisada pelas lipoxigenases, que são enzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos insaturados contendo o grupo 1-4 pentadieno para produzir os hidroperóxidos correspondentes, resultando na deterioração do óleo. Ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) também podem ser oxidados pela lipoxigenase (ZAMORA et al., 1991; OETTERER et al., 2006; CHOE; MIN, 2009). No sistema vegetal ocorrem em várias partes da planta desempenhando diversas funções como: crescimento, reserva e proteção. Também são distribuídas em microorganismos e enzimas com atividade parecida e podem ser encontradas em tecidos animais. Os principais substratos para as enzimas lipoxigenases em plantas superiores são os ácidos linolênico e linoleico, que atuam conforme representado na Figura 1, sendo que estas enzimas não oxidam o ácido oleico (BATISTA et al., 2002; OETTERER et al., 2006).

Figura 1 Esquema representativo da oxidação do ácido linoleico pela lipoxigenase.



Fonte: Choe e Min (2009).

A lipoxigenase é uma proteína ligada a um metal que possui um átomo de ferro no seu centro. Ela é ativada por seu produto e durante a oxidação o Fe<sup>+2</sup> passa a Fe<sup>+3</sup>, há retirada do átomo de hidrogênio

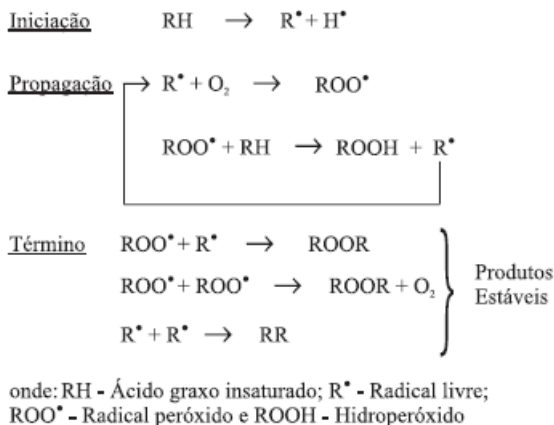
metilênico do sistema 1-4 pentadieno do substrato e oxidação do átomo de hidrogênio a um próton. O radical pentadienil ligado à enzima é rearranjado em um sistema dieno conjugado, seguido da absorção de oxigênio. O radical peroxila formado é reduzido pela enzima, e após adição de um próton, o hidroperóxido é liberado. Estes hidroperóxidos produzidos são decompostos pela liase de hidroperóxidos com a formação de vários aldeídos que alteram o sabor (OETTERER et al., 2006).

### 1.2.1.2 Autooxidação

A autooxidação é o principal mecanismo de rancidez oxidativa e ocorre quando o oxigênio atmosférico ou dissolvido na amostra reage com a dupla ligação e o respectivo carbono  $\alpha$ -metilênico dentro da cadeia hidrocarbonada do ácido graxo presente em óleos e gorduras, levando a formação de hidroperóxidos. Mesmo os hidroperóxidos sendo mais estáveis que as espécies radicalares, eles ainda são agentes oxidantes fracos que se decompõem a radicais peroxil ( $\text{LOO}^*$ ) e alcoxil ( $\text{LO}^*$ ), levando assim a formação de produtos secundários da oxidação como, aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos e lactonas. Os produtos secundários da oxidação são responsáveis por prejudicar o gosto, sabor, textura em alimentos e por reações em tecidos biológicos e no corpo humano (VALENZUELA; NIETO, 1996; KAMAL-ELDIN et al., 2003; SCHAICH, 2005; OETTERER et al., 2006).

A sequência de reações inter-relacionadas envolvidas no processo de autooxidação são a iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor. Existe um período de indução inicial, em que se atinge um determinado nível de concentração de radicais livres. Na propagação os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, surgindo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico. Na terminação, etapa final que ocorre simultaneamente com a propagação, dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (RAMALHO; JORGE, 2006; ORDÓNEZ et al., 2007). O esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica.



Fonte: Farmer et al. (1942); Ramalho e Jorge (2006).

A reação de autooxidação em alimentos é autocatalítica e as reações se processam a velocidade aceleradas a medida que a oxidação prossegue. A velocidade de oxidação do alimento ou da substância é afetada pela composição em ácidos graxos, pelo grau de instauração, pela presença e atividade de pró e antioxidantes, pela pressão parcial de hidrogênio, pela natureza da superfície exposta ao oxigênio, pelas condições de armazenamento, como temperatura, luz e umidade, e pelo aporte energético geral. O efeito destes fatores pode ser minimizado basicamente com refrigeração, acondicionamento e armazenamento corretos, embora as reações não cheguem a deter-se por completo, pois requerem uma energia de ativação reduzida (OETTERER et al., 2006; RAMALHO; JORGE, 2006).

### 1.2.1.3 Fotooxidação

A constatação de que diferentes hidroperóxidos são produzidos quando a luz e certas moléculas sensibilizadoras estão presentes e de que o oxigênio singlete (elétrons emparelhados no mesmo orbital e com spin opostos) é uma espécie muito mais reativa do que o oxigênio no estado estacionário ou basal (oxigênio triplete, dois elétrons livres em orbitais separados com o mesmo sentido de rotação) levou a formulação do mecanismo de fotooxidação como rota alternativa para a produção de

hidroperóxidos. O arranjo de elétrons do oxigênio triplete não permite uma reação direta com as moléculas de lipídios, como ocorre no caso do oxigênio singlete. O oxigênio singlete pode ser gerado pela interação de luz, fotosensibilizadores e oxigênio. Diferencia-se da autooxidação pela presença de moléculas de oxigênio de configuração eletrônica nos níveis de energia dos orbitais moleculares (HO; SHAHIDI, 2005; SCHAICH, 2005; OETTERER et al., 2006).

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de sensibilizadores (como por exemplo a clorofila, mioglobina, hemoglobina, grupos porfirina, riboflavina entre outros), que sob influência da luz transformam o oxigênio normal (triplete) em um oxigênio no estado singlete. O processo envolve reações radiculares, cujo resultado é a formação de hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência da luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos. A velocidade da reação não é afetada por sequestradores ou bloqueadores de radicais peroxilo e é inibida pelos carotenos, pois atuam inibindo a reação por um mecanismo de transferência de elétrons (SILVA et al., 1999; OETTERER et al., 2006).

### **1.3 Antioxidantes**

Antioxidantes são moléculas orgânicas de origem sintética ou natural que podem evitar ou retardar o desenvolvimento ou progresso da rancidez oxidativa. Várias pesquisas têm sido realizadas com o uso de antioxidantes. Antioxidantes sintéticos têm sido motivo de preocupação durante as duas últimas décadas devido a efeitos deletérios e potencialmente perigosos observados em alguns destes (VALENZUELA; NIETO, 1996).

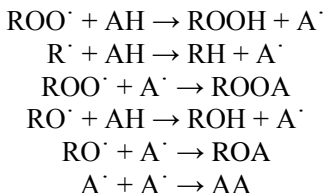
Os antioxidantes estão naturalmente presentes nos alimentos ou podem ser adicionados ou formados durante o processamento. Antioxidantes em alimentos devem ser razoáveis no preço, não tóxicos, estáveis, efetivos a baixas concentrações e não devem alterar sabor, odor, cor e textura. Os efeitos dos antioxidantes na oxidação dos alimentos são dependentes de sua concentração, polaridades e presença de outros antioxidantes (ORDONEZ et al., 2007; CHOE; MIN, 2009).

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005) e de acordo com a sua origem, os antioxidantes podem

ser classificados em sintéticos ou naturais (VALENZUELA; NIETO, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes primários, também chamados de Tipo 1, em função da natureza química destas moléculas, podem atuar como doadores de hidrogênio aos radicais livres e atrasar ou inibir a fase de iniciação ou interromper a fase de propagação da autoxidação. Dessa forma o átomo de hidrogênio do antioxidante é abstraído pelos radicais livres com maior facilidade do que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas, formando assim espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte procedente do antioxidante (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005), conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 Mecanismo de um antioxidante primário, simbolizado por AH.



Fonte: Wanasundara e Shahidi (2005).

Os antioxidantes primários mais utilizados são os derivados *orto* e *para* dos compostos fenólicos, já que, devido a localização do elétron entre duas formas de ressonância, constituem radicais livres relativamente estáveis. Os que se utilizam com mais frequência são ésteres de ácido gálico (galato de propila), terc butil hidroquinona (TBHQ), butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) (ORDÓNEZ et al., 2007).

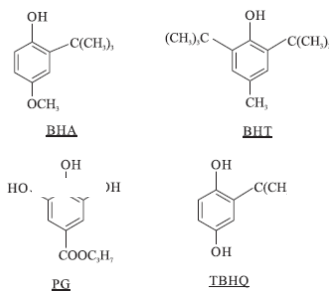
Antioxidantes secundários são também chamados de preventivos ou Tipo 2. A grande diferença destes em relação aos primários é que os secundários não convertem radicais livres em moléculas estáveis. Eles atuam como quelantes de metais, exemplo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e ácido cítrico, provendo hidrogênio para os antioxidantes primários, decompondo hidroperóxidos em espécies não radicais, desativando o oxigênio singlete, absorvendo radiação ultravioleta ou removendo o oxigênio. Dentre os antioxidantes secundários, os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade podendo aumentar a ação dos antioxidantes primários quando

usados em combinação adequada. Os agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, responsáveis por catalisar a oxidação lipídica, através da ação de um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular. Os removedores de oxigênio através de reações químicas estáveis agem tornando as moléculas de oxigênio, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; ORDÓNEZ et al., 2007).

### 1.3.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são amplamente aplicados em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentação humana e animal. Os mais populares são os que possuem uma estrutura fenólica. A presença de um anel conjugado e grupos hidroxilas permite estabilizar radicais livres. A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um hidrogênio a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), propil galato (PG) e terc butil hidroquinona (TBHQ) (VALENZUELA; NIETO, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006), cujas estruturas estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4 Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.



Fonte: Wanasundara e Shahidi (2005).

Existem alguns problemas relativos a segurança e toxicidade destes antioxidantes, relacionados com o metabolismo e possível absorção e acúmulo nos tecidos e organismo (ABDALLA; ROOZEN, 1999; RAMALHO; JORGE, 2006). A substituição dos antioxidantes sintéticos por substâncias naturais e seguras tem sido defendida cada vez mais na indústria de alimentos. Esta tendência tem sido imposta pela preferência mundial dos consumidores para o uso de antioxidantes naturais, que podem existir inerentemente nos alimentos ou ser adicionados intencionalmente durante o processamento (KIOKIAS et al., 2009).

### **1.3.2 Antioxidantes naturais**

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados industrialmente estão o ácido ascórbico e seus derivados, carotenóides, tocoferóis, tocotrienóis e compostos fenólicos de extratos de diversas fontes vegetais (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Os compostos fenólicos de origem natural, presentes em extratos de diversas fontes vegetais, pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, possuem um anel aromático no qual um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila e/ou seus derivados funcionais tais como ésteres, metoxilas, glicosídeos entre outros. A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos (forma conjugada com açúcares). Eles são muito reativos quimicamente, sendo facilmente oxidáveis. Possuem propriedade de complexação de metais e por serem aromáticos, apresentam intensa absorção na região do ultravioleta (UV) (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

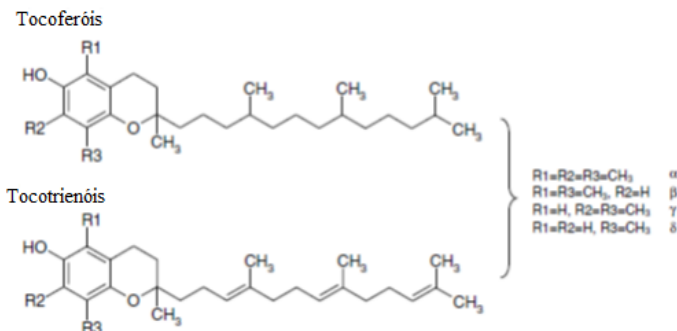
Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático (RAMALHO; JORGE, 2006).

Como classes de compostos fenólicos em plantas podem ser citados: fenólicos simples, benzoquinonas, ácidos hidroxibenzóicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides, (cumarinas, isocumarinas, cromonas), naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonóides, isoflavonóides,

lignananas, neolignananas, diflavonóides, ligninas e taninos condensados (proantocianidinas) (BALASUNDRAM et al., 2006).

Os tocoferóis por serem um dos melhores antioxidantes naturais são amplamente aplicados para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados. Eles possuem estruturas químicas derivadas do anel cromanol, substituídas por um grupamento hidroxila e por um, dois ou três grupos metílicos no anel fenólico. Os tocoferóis e tocotrienóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais, a maior fonte natural dos tocoferóis é o óleo de soja, mas também aparecem em alguns tipos de pescado e atualmente são fabricados por síntese. Já tocotrienóis estão presentes em óleo de palma, óleo de farelo de arroz, cereais e legumes. Tocoferóis e tocotrienóis são definidos segundo a localização dos grupos metila no anel, sendo chamados de:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Na Figura 5 podem ser visualizadas as suas estruturas. Em geral, tocotrienóis têm atividade maior na oxidação lipídica. A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia, o que depende da temperatura. Tocóis são solúveis em óleos vegetais, mas não em água e são utilizados em alimentos com deficiência de antioxidantes naturais, como gorduras animais (SHAHIDI; ZHONG, 2005; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 5 Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis.



Fonte: Laguerre et al. (2007).

Para a identificação e isolamento de compostos bioativos em fontes naturais (como frutas, sementes e especiarias) é necessária a



realização da extração com solventes de polaridades diferentes, devido a diferenças na polaridade (mais ou menos polares ou apolares) destes compostos antioxidantes. Etanol e água são amplamente utilizados, devido a segurança e abundância, e solventes apolares são os mais empregados para remoção de polifenóis. As pesquisas enfocam essas extrações com o objetivo de comparar seus resultados e encontrar a melhor alternativa para sua aplicação em alimentos (MOURE et al., 2001; ANDREO; JORGE, 2006).

### 1.3.2.1 Extrato de alecrim

A planta medicinal mais empregada como antioxidante na indústria alimentícia é o alecrim (*Rosmarinus officinallis*), que pertence a família da hortelã, seu efeito antioxidante é uma propriedade adicional ao sabor e ao aroma característicos que proporciona ao alimento. As folhas frescas e secas do alecrim, usadas com frequência na cozinha tradicional mediterrânea contém uma série de compostos biologicamente ativos, onde se retiram os extratos alcoólicos, que são utilizados depois da evaporação do álcool. Possui gosto amargo, adstringente, que complementa uma grande variedade de alimentos. São constituídos por pelo menos 45 compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, dos quais os mais importantes são o carnosol, o ácido carnósico, o ácido rosmarínico, o ácido caféico, o rosmadial, o ácido 12-metoxicarnósico e o epi e iso-rosmanol (FRANKEL et al., 1996; ORDONEZ et al., 2007; ERKAN et al., 2008; JUSTO et al., 2008; BUBONJA-SONJE et al., 2011; JIANG et al., 2011).

O extrato possui uma longa lista de atribuições referentes aos seus usos medicinais, entre elas propriedades antibacterianas e antioxidantes. É conhecido por ser um agente quimiopreventivo eficaz, antimutagênico e tem demonstrado não ser tóxico nos modelos animais (OLUWATUYI et al., 2004). Devido a natureza lipofílica do extrato, este pode ser facilmente utilizado em óleos e gorduras para prevenir a oxidação (AZIZKHANI; ZANDI, 2010). O ácido carnósico é um antioxidante lipofílico que elimina o oxigênio singlete, radicais hidroxila e radicais peroxila, evitando assim a peroxidação lipídica e a ruptura de membranas biológicas (BABOVIC et al., 2010).

Os teores de fenólicos totais podem apresentar variações em relação as diferentes amostras e aos diferentes métodos de extração (ERKAN et al., 2008; JUSTO et al., 2008), e assim influenciar diretamente na atividade antioxidante dos extratos (TERPINC et al.,

2009), podendo variar de 10 mg GAE/g (GIBIS; WEISS, 2012) até 450 mg GAE/g de acordo com Bubonja-Songe et al. (2011). O mesmo ocorre para teores de taninos condensados, que diferem em relação a fase de maturação e a parte da planta (YOSR et al., 2013). Ensaio de atividade antioxidante também apresentam grandes variações, como no caso do ABTS, podendo ser encontrados valores entre  $1,9 \pm 0,29$  mmol TEAC/g (GIBIS e WEISS, 2012) e  $352 \pm 28$  mmol TEAC/g (JUSTO et al., 2008). Para a análise de DPPH, valores próximos a 90 mmol TEAC/g podem ser encontrados (JUSTO et al., 2008; MAIRUTTI et al., 2008).

Sebranek et al. (2005) reportaram proteção significativa da cor e frescor em salsicha de carne de porco adicionada de extrato de alecrim. O extrato de alecrim mostrou ser efetivo também na proteção da oxidação do óleo de amendoim (CHU e HSU, 1999) e mostrou a melhor atividade antioxidante na proteção do óleo de girassol armazenado a 60 °C, quando comparado ao  $\alpha$ -tocoferol, ácido cítrico e palmitato de ascorbila (HRAS et al., 2000). O uso do extrato reduziu significativamente a oxidação lipídica em patês de fígado (DOOLAEGE et al., 2012), reduziu a oxidação em salmão marinho congelado durante o armazenamento (TIRONI et al., 2010) e promoveu proteção em pães com molho de óleo, alho e salsa (FRUTOS; HERNANDEZ-HERRERO, 2005).

As pesquisas realizadas com extrato de alecrim indicam que o mesmo tem potencial para ser adicionado a alimentos como um antioxidante natural, sem alterações de sabor mensuráveis pelos consumidores. Além disso, o efeito sinérgico oferece a possibilidade de utilizar extrato de alecrim e conhecidos antioxidantes comerciais (exemplo BHT) como misturas, baixando assim a quantidade de antioxidante sintético para ser adicionado e reduzindo ou eliminando a possibilidade de toxicidade (BASAGA et al., 1997).

Em termos legislativos, na União Européia o extrato de alecrim teve seu uso aprovado, como aditivo alimentar, função de antioxidante, em 8 de Abril de 2011 mediante o Regulamento de Execução (EU) n° 344/2011 da Comissão. No *The International Numbering System for Food Additives* (INS), o extrato de alecrim aparece como um aditivo com finalidade antioxidante na respectiva denominação internacional INS n° 392. O alecrim não consta na lista, atualizada em 2012, relativa a aditivos permitidos em alimentos do Codex General Standard for Food Additives (Codex Alimentarius, 2013). Na legislação brasileira não foi encontrada nenhuma especificação a respeito do uso do extrato de alecrim nos alimentos.

### 1.3.2.2 Extrato de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]

O processamento da noz-pecã resulta em um volume aproximado de 40 a 50% de casca residual (WORLEY, 1994), sendo que no Brasil a comercialização é feita para o preparo de chá. A casca é rica em compostos fenólicos e taninos, que são responsáveis pela adstringência do chá, sendo assim esta casca pode constituir uma fonte alternativa de compostos capazes de agir como antioxidantes (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007). A noz-pecã tem sido classificada entre os alimentos com o maior conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante (WU et al., 2004).

Prado e colaboradores (2009b) reportaram que infusões de casca de noz-pecã apresentaram alto conteúdo de fenólicos totais e taninos condensados, assim como elevada atividade antioxidante. Os mesmos autores (2009c) obtiveram a torta da casca de noz-pecã e submeteram-na a extrações sequenciais com acetona, álcool e água. A fração obtida com acetona apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais e taninos condensados, assim como alta atividade antioxidante. Em outro estudo, os mesmos autores (2009a) realizaram extração sequencial da casca de noz-pecã com éter, acetona, álcool e água. A fração alcoólica apresentou os maiores teores de fenólicos totais e taninos condensados, assim como maior atividade antioxidante, através dos métodos de ABTS e DPPH.

Estudos *in vivo* demonstram as propriedades do extrato aquoso da casca de noz-pecã para prevenir o dano oxidativo induzido pela exposição à fumaça de cigarro e os efeitos deletérios do etanol no fígado indicando propriedades antioxidantes e hepatoprotetora em ratos (MÜLLER et al., 2011; RECKZIEGEL et al., 2011).

Mais recentemente, Prado e colaboradores (2013), realizaram análises de composição centesimal, cor, fenólicos totais, taninos condensados, atividade antioxidante e espectroscopia de infravermelho em diferentes variedades e safras de casca de noz-pecã, assim como do extrato seguido de atomização em *Spray Dryer*. Altos níveis de fenólicos totais e taninos condensados foram encontrados, os quais resistiram às altas temperaturas da atomização. Em outro estudo, segundo Prado e colaboradores (2014), micropartículas contendo extrato de casca de noz-pecã foram obtidas por atomização em *Spray Dryer* e

adicionadas em óleo de soja, estas aumentaram a estabilidade oxidativa em relação ao índice de peróxidos.

Prado e colaboradores (2013) avaliaram o efeito do processo de extração (infusão, infusão seguida de atomização em *Spray Dryer*, extração etanólica e extração supercrítica) sobre o teor e o perfil de compostos fenólicos, a atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e, a atividade antimicrobianos extratos. A infusão e a extração alcoólica apresentaram conteúdo de compostos fenólicos totais e taninos condensados e a atividade antioxidante (ABTS e DPPH) significativamente superiores à extração supercrítica. O processo de atomização em *Spray Dryer* do extrato obtido através de infusão concentrou significativamente as amostras, acentuando a atividade antioxidante avaliada *in vitro*. Os extratos obtidos através de infusão e extração alcoólica mostraram-se eficientes na inibição do crescimento da *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Bacillus cereus*, indicando que os mesmos apresentaram atividade antimicrobiana e bactericida para estes micro-organismos de interesse em alimentos.

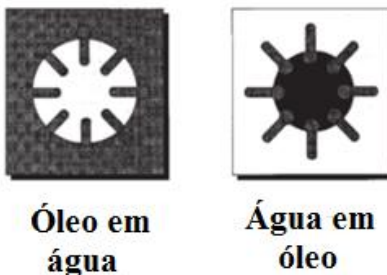
La Rosa e colaboradores (2011), também reportam elevadas quantidades de compostos fenólicos em pecãs, principalmente taninos condensados e hidrolisáveis, mas também flavonóides monoméricos e ácidos hidroxibenzóicos, sendo que todos conferem as nozes pecãs alta atividade sequestrante de radicais livres. A concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram maiores nas cascas do que nas amêndoas, e estas foram influenciadas pela região nas quais foram cultivadas.

## 1.4 Sistemas lipídicos

Uma emulsão é uma dispersão de um líquido em outro, onde cada líquido é imiscível ou fracamente miscível (usualmente óleo e água). Elas são obtidas por cisalhamento de fluidos imiscíveis até fragmentação de uma fase sobre a outra, formando gotículas pequenas e esféricas. Nos alimentos, geralmente o tamanho destas partículas está entre 0,1 e 100  $\mu\text{m}$ . Podem ser diluídas ou concentradas e exibem propriedades e dinâmicas internas diferentes. Emulsões são caracterizadas em relação a localização das fases nos sistemas, portanto podem ser do tipo óleo em água (o/a), onde gotículas de óleo estão dispersas em água e água em óleo (a/o), cujas gotículas de água encontram-se dispersas em óleo, conforme mostrado na Figura 6. O tipo

da emulsão é determinado principalmente pela razão óleo e água; sendo assim, é possível obter inversão de fase alterando esta razão (VAN NIEUWENHUYZEN; SZUHAJ, 1998; MCCLEMENTS; DECKER, 2000; MCCLEMENTS, 2003; CAPEK, 2004; SAHIN; SUMNU, 2006).

Figura 6 Tipos de emulsão, óleo em água e água em óleo.



Fonte: Van Nieuwenhuyzen e Szuhaj (1998).

O tamanho da gotícula na emulsão é dependente das condições de homogeneização. A homogeneização é realizada com equipamentos específicos como: homogeneizador, agitador de alta velocidade, válvula homogeneizadora de alta pressão e homogeneizador ultrassônico. Emulsões produzidas apenas por forças de cisalhamento a pressão atmosférica possuem um tamanho de gotícula significativamente maior do que emulsões produzidas com aumento de pressão. O tamanho da gotícula determina quanto o lipídio está disponível para cristalizar em uma área específica. Quanto menor o tamanho da gotícula, menor é o tamanho do cristal formado na fase oleosa, aumentando a estabilidade da emulsão. Se o tamanho da gotícula é pequeno e uniforme, então a cristalização é mais provável de acontecer de forma homogênea, porque a gordura será o local da nucleação (ROUSSEAU, 2000; COUPLAND, 2002; MCCLEMENTS, 2003).

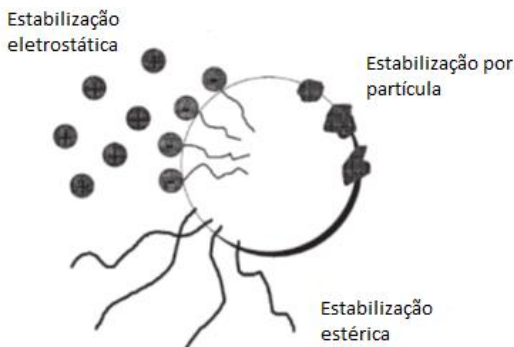
No entanto, se a gotícula tornar-se pequena demais, os cristais de gordura podem quebrar a interface, causando instabilidade através da coalescência. Encontrar um tamanho de gotícula que permita a cristalização de gordura, mas que os cristais não quebrem através da interface causando instabilidade, é um atributo desejável e está diretamente relacionada com a condição do processo de homogeneização (ROUSSEAU, 2000).

Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis porque existe a energia livre necessária para aumentar a área de superfície entre as fases óleo e água e porque o óleo e a água possuem densidades diferentes. A instabilidade das emulsões depende do conteúdo de gorduras, o tipo e razão de emulsificante, a viscosidade da fase contínua, o volume da fração na fase dispersa, a distribuição do tamanho de partícula e a temperatura (BELHAJ et al., 2010).

Emulsões tendem a separar-se em um sistema que consiste de uma camada de óleo (baixa densidade) sobre uma camada de água (maior densidade), um sistema em que a área de contato entre o óleo e a água é minimizada. Para formar emulsões que sejam cineticamente estáveis por um razoável período de tempo (algumas semanas, meses ou anos, substâncias químicas conhecidas como emulsificantes devem ser adicionadas antes da homogeneização (DALGLEISH, 1997; MCCLEMENTS; DECKER, 2000; CAPEK, 2004).

A estabilização das gotículas pode ser alcançada através da estabilização eletrostática, onde emulsificantes, com parte hidrofílica e lipofílica em cada molécula, se concentram na interface e reduzem a tensão interfacial. Através da estabilização por partícula sólidas na forma de cristais de gordura (em alimentos como manteiga e margarina) e também através da estabilização estérica (onde emulsionantes aniônicos e polímeros solúveis, como proteínas, reduzem a tensão interfacial). Além da estabilização estérica, polímeros como amidos e hidrocolóides com propriedade gelificante aumentam a viscosidade da emulsão. Com isso a coalescência dos agregados e *creaming* das gotas são retardados, aumentando a estabilidade destas dispersões (VAN NIEUWENHUYZEN; SZUHAJ, 1998; PATINO; NIÑO, 1999). Na Figura 7, os princípios da estabilização de emulsões esta representado.

Figura 7 Princípios da estabilização de emulsões.



Fonte: Van Nieuwenhuyzen e Szuhaj (1998).

A velocidade de separação de fases em uma emulsão pode ser representada pela equação da Lei de Stokes (Equação 1),

$$V = \frac{2r^2 (D_1 - D_2) g}{9n} \quad (1)$$

Onde:

V = velocidade de sedimentação das partículas dispersas;

r = raios das partículas;

D<sub>1</sub> = densidade da fase dispersa;

D<sub>2</sub> = densidade da fase dispersante;

g = aceleração da gravidade;

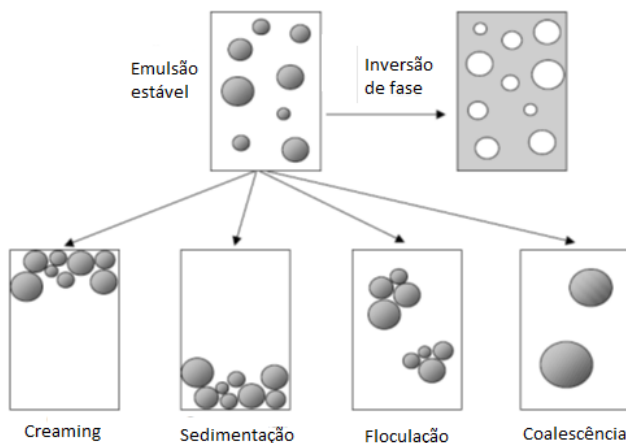
n = viscosidade da fase dispersante.

Como pode ser observado na Equação 1, a velocidade de separação de fases é maior quanto maiores forem as gotículas da fase interna, quanto maior for a diferença de densidade entre as duas fases e quanto menor for a viscosidade da fase externa (ATTWOOD, 2006).

Devido a instabilidade das emulsões, após algum tempo, qualquer emulsão irá colapsar em duas fases, na tentativa de diminuir a energia livre ( $\Delta G$ ). Existem 5 mecanismos que contribuem para a instabilidade das emulsões: 'creaming', floculação, 'Amadurecimento de Ostwald', coalescência e inversão de fase (ROUSSEAU, 2000). O 'creaming' (ou assentamento) ocorre devido às diferenças de densidade entre as duas fases sob influência da gravidade o que leva a separação de fases (BEYDOUN et al., 1998). A floculação é melhor descrita como a agregação de partículas devido às forças fracas atrativas entre os colóides, depende da energia de interação em função da distância entre

as partículas. A energia de interação é uma combinação de forças atrativas e repulsivas. Em emulsões, forças de atração são dependentes de forças de Van der Waals enquanto a repulsão é devido aos surfactantes na interface. Durante a floculação as partículas mantêm sua integridade estrutural. Durante a coalescência, duas gotículas irão formar uma gotícula maior; para ocorrer, uma energia inicial deve ser superada e, após ocorre rapidamente. Coalescência parcial pode levar a inversão de fase onde uma emulsão óleo em água se torna água em óleo, como durante a agitação da manteiga (ROUSSEAU, 2000). No ‘amadurecimento de Ostwald’ há o crescimento de gotas maiores à custa de menores e está relacionado com diferença de solubilidade entre as gotas pequenas e grandes (DICKINSON et al., 1999). Os diferentes processos que podem levar ao colapso de emulsões são apresentados na Figura 8.

Figura 8 Diferentes processos que podem levar ao colapso de emulsões.



Fonte: McClements (2003).

## 1.5 Margarinas

Na metade do século XIX, surgiu um desenvolvimento em métodos de preparação de alimentos, o que levou a novos produtos e a consequente industrialização. Na Europa, a Nestlé produziu leite em pó e leite condensado, e Oetker inventou e lançou o fermento em pó, no



final do século XIX. Em 1860, o imperador francês, Napoleão III ofereceu uma recompensa a quem conseguisse encontrar um substituto satisfatório e mais barato para a manteiga, esta precisava estar disponível em grande quantidade e a um baixo custo (BOCKISCH, 1998), visando atender a escassez de manteiga causada pelo aumento da população urbana durante a revolução industrial (CHRYSAN, 2005) e para nutrir o seu exército. No ano de 1869, o químico Hippolyte Mège-Mouriés inventou e patenteou uma substância a que chamou oleomargarina (mais tarde margarina), que preparou com sebo de vaca, à qual extraía a porção líquida sob pressão e depois deixando-a solidificar; em combinação com butirina e água resultando em um substituto para a manteiga, com sabor similar (BOCKISCH, 1998).

O processo original foi concebido para imitar a produção de gordura de manteiga. Sebo fresco foi submetido a um processamento a baixas temperaturas com o suco gástrico artificial e lentamente arrefecida até aproximadamente 26 °C para cristalizar parcialmente a gordura. A oleína, uma fração amarela semilíquida, foi então dispersa em leite desnatado, juntamente com o tecido do úbere da vaca. A emulsão foi agitada durante várias horas e água fria foi adicionada à batedeira, fazendo com que a gordura se solidificasse. A água foi drenada, e a massa granular que permaneceu foi amassada e salgada. Durante o século XIX, algumas margarinas foram preparadas a partir de banha ou sebo de boi não fraccionada, onde óleos tais como de sementes de algodão ou de amendoim também foram adicionados para reduzir o ponto de fusão da mistura. No início de 1900, cerca de 100% das margarinas de óleos vegetais, foram formuladas com óleo de coco e palmiste (CHRYSAN, 2005). O nome usado para o novo produto, margarina, é derivado da palavra grega para pérola, ‘margarites’ (BOCKISCH, 1998).

A margarina, desde a sua invenção, tem passado por sucessivas mudanças, tanto em seu processo de fabricação quanto em sua formulação, buscando melhorias em sabor e aroma, em estabilidade durante o seu armazenamento, em propriedades físicas, como também em satisfazer as novas exigências nutricionais e dietéticas que se impõem (BOCKISCH, 1998). Além de fonte de óleos e gorduras, a margarina também é fonte de vitamina A, cuja adição é obrigatória, e de vitamina E, presente naturalmente em óleos vegetais, e podem ser enriquecidas com outras vitaminas e minerais (CHRYSAN, 2005).

Desde o início, a margarina tem sido desenvolvida como uma gordura sob medida. Suas propriedades podem ser ajustadas de acordo com a demanda, seja para panificação ou cozinha. Isto é diretamente

refletido na quantidade que este produto é produzido por ano. Na Europa, essa quantidade individual de cada país reflete em seus hábitos alimentares. No sul da Europa, o consumo de óleos é maior que o de gorduras emulsionadas. Na Itália e Espanha, o consumo é de menos de 1,5 kg por pessoa por ano. Na Holanda e Dinamarca, grande quantidade de margarina é consumida, este último possui o maior consumo per capita da Europa, norte americanos consomem 5,5 kg por pessoa por ano, de acordo com dados de 1995. No Brasil, o consumo gira em torno de 2,1kg per capita por ano (BOCKISCH, 1998).

De acordo com o Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997, entende-se por margarina o produto gorduroso em emulsão estável com leite ou seus constituintes ou derivados, e outros ingredientes, destinados à alimentação humana com cheiro e sabor característico. A gordura láctea, quando presente não deverá exceder a 3% m/m do teor de lipídios totais (BRASIL, 1997).

Dentre os constituintes obrigatórios, está o leite, seus constituintes ou derivados, óleos e/ou gorduras de origem animal e/ou vegetal e água. Dentre os ingredientes opcionais, podem ser citados: culturas de fermentação, gema de ovo, sal (cloreto de sódio), amidos e/ou amidos modificados, açúcares e/ou glicídios (exceto poliálcoois), proteínas comestíveis (vegetais e/ou animais), maltodextrina, vitaminas A em quantidade mínima de 1500 UI por 100g de produtos e de no máximo de 5000 UI por 100g de produto, vitaminas e/ou sais minerais e/ou de outros nutrientes (BRASIL, 1997). Os teores de cada constituinte são definidos através das condições de processamento e de testes de preferência com consumidores (CHRYSAN, 2005).

A fase lipídica representa o maior custo do produto e por isso é considerado o principal constituinte (DORSA, 2004). A escolha da gordura segue três critérios, a escolha de certas propriedades físicas, a presença de alegações na embalagem e considerações nutricionais e fisiológicas (BOCKISCH, 1998). A adição de certo percentual de óleo vegetal à gordura que irá compor a margarina tem por função: diminuir os custos, aumentar a untabilidade e diminuir o teor de gordura. Os óleos mais usados são o de algodão, milho e palma por serem mais saturados (DORSA, 2004).

A hidrogenação de gorduras é a reação química que consiste na incorporação de hidrogênio a ligação dupla dos ácidos graxos insaturados, esta reação é de grande importância na indústria, pois permite a conversão de óleos em gorduras plásticas utilizáveis na indústria de margarinas, mas que podem levar a formação de ácidos graxos trans. Estas são amplamente utilizadas na produção de

margarinas de menor custo e para uso em restaurantes (SKEAFF, 2009). As novas tecnologias requeridas para o desenvolvimento de alternativas de gorduras zero *trans* são relativamente caras, o que pode resultar em altos preços do produto final (KODALI, 2005). As principais preocupações com os efeitos dos ácidos graxos *trans* na saúde têm aumentado, uma vez que estes isômeros são estruturalmente similares às gorduras saturadas, modificam as funções metabólicas das gorduras poliinsaturadas e competem com os ácidos graxos essenciais em vias metabólicas complexas (ORDONEZ et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

A interesterificação consiste em alternativa tecnológica ao processo de hidrogenação parcial, uma vez que viabiliza a produção de óleos e gorduras com funcionalidades específicas. Devido à crescente preocupação com o impacto nutricional dos ácidos graxos *trans* na saúde, a interesterificação tem-se mostrado como o principal método para preparação de gorduras plásticas com baixos teores de isômeros *trans* ou mesmo ausência destes compostos. O processo de interesterificação permite modificar a posição dos ácidos graxos no triglicerídeo, alterando consequentemente sua consistência e utilidade (ORDONEZ et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

O leite tem como função tornar o produto similar a manteiga, dando um sabor mais próximo, apesar do baixo percentual utilizado (DORSA, 2004). A maioria das margarinas contém sólidos do leite que durante a fritura superficial são responsáveis pela coloração marrom (reação da Maillard, interação entre proteína e lactose), esta propriedade é exigida pela maioria dos consumidores, as proteínas do leite também reduzem a tendência a oxidação durante a fritura (BOCKISCH, 1998; CHRYSAN, 2005).

A água é adicionada a formulação para obter uma emulsão característica, e é veículo para o sal, vitaminas e outros aditivos hidrossolúveis (DORSA, 2004). O sal é importante pela formação do eletrólito que quando da ingestão de produto facilita a quebra da emulsão realçando o sabor da margarina (DORSA, 2004). Atua como redutor da sensibilidade microbiológica, podendo parar completamente a atividade microbiológica, e atua como flavorizante, sua quantidade pode diferir entre os países (BOCKISCH, 1998).

### **1.5.1 Antioxidantes, emulsificantes e aditivos em margarinas**

Os aditivos que podem ser utilizados em margarinas são os antioxidantes, os emulsificantes, os estabilizantes, as vitaminas e os corantes, ele podem ser hidrossolúveis ou lipossolúveis.

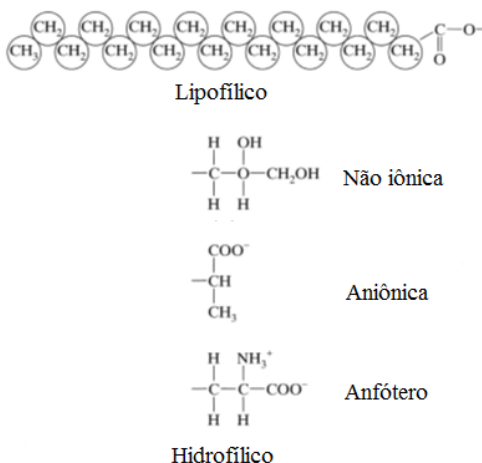
Os emulsificantes são multifuncionais nas margarinas, uma vez que reduzem a tensão superficial entre a fase aquosa e fase oleosa, estabilizam o produto acabado durante o armazenamento e evitam a coalescência da fase aquosa. Em margarinas os emulsificantes mais utilizados são a lecitina e os monoglicerídeos (DORSA, 2004; CHRYSAN, 2005).

Emulsionante ou surfactante são termos aplicados àquelas moléculas que migram para as interfaces entre duas fases físicas, portanto são mais concentrados na região interfacial do que na fase da solução (STAUFFER, 2005). Também podem ser descritas como moléculas tensoativas que adsorvem à superfície de gotículas recém-formadas durante a homogeneização e fornecem uma membrana protetora que impede a floculação ou a coalescência das gotas (DALGLEISH, 1997; MCCLEMENTS; DECKER, 2000; CAPEK, 2004). Uma vez presentes na superfície da gota, eles facilitam a quebra de gotículas e formam uma membrana protetora que impede a agregação das gotas. O tamanho da gotícula também é um fator quando se considera a cobertura do emulsificante. Para um dado nível de gordura, gotas menores têm uma maior área de superfície e mais emulsificante é necessário para cercá-las, produzindo um sistema estável, formando uma barreira contra a coalescência (DALGLEISH, 1997; MCCLEMENTS e DECKER, 2000; ROUSSEAU, 2000).

Conforme mostrado na Figura 9, os emulsificantes possuem uma parte lipofílica e uma hidrofílica, por esta razão são chamados de anfifílicos. A parte lipofílica destes tensoativos alimentares geralmente é uma cadeia longa de ácidos graxos obtidos a partir de uma gordura ou de um óleo de qualidade alimentar. A porção hidrofílica é não iônica (glicerol), aniônica (carregado negativamente, exemplo: lactato) ou anfótero (carregado de cargas negativas e positivas, exemplo: serina). Os catiônicos (carregados positivamente) são geralmente bactericidas e tóxicos, portanto não são utilizados como aditivos alimentares. Exemplos de surfactantes são monoglicerídios (não iônico), lactilato de estearoil (aniônico) e lecitina (anfótero). Os não iônicos são relativamente sensíveis ao pH e concentração de sal na solução aquosa, portanto sua funcionalidade por ser influenciada (STAUFFER, 2005). Os emulsificantes utilizados na indústria de alimentos são moléculas de monoglicerídios e derivados (monoglicerídeo succinil), emulsificantes de sorbitol (monoestearato de sorbitano), emulsificantes aniônicos

(estearil fumarato de sódio), poliglicerol (diester sacarose) e lecitina, utilizada em margarinas, na quantidade de 0,05 a 0,1% (DALGLEISH, 1997; MCCLEMENTS; DECKER, 2000; STAUFFER, 2005).

Figura 9 Representação estrutural dos emulsificantes lipofílicos e hidrofílicos.



Fonte: Stauffer (2005).

Dependendo da relação grupo hidrofílico e hidrofóbico, os emulsificantes podem ter uma maior solubilidade em uma das duas fases, óleo ou água. No entanto, existem algumas características listadas que podem ser usadas para classificá-los: carga do grupo hidrofílico, natureza do grupo lipofílico, solubilidade em vários solventes, razão entre grupos hidrofílicos e lipofílicos, fase cristalina e geometria molecular. O valor de balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) também é outra classificação, sendo uma medida da relação grupo hidrofílico (cabeça) e cauda lipofílica. É uma relação útil para selecionar um emulsificante para uma aplicação em particular (MCCLEMENTS; WEISS, 2005). Emulsificantes com valores BHL abaixo de 9 são lipofílicos, com valores entre 8 e 11 são intermediários e com valores entre 11 e 20 são hidrofílicos (SAHIN; SUMNU, 2006).

Conservantes podem ser divididos em antioxidantes, eliminadores de metal, e agentes antimicrobianos (CHRYSAN, 2005). Ácidos, reduzem o pH e adicionam estabilidade microbiológica, além de

criar um gosto melhor e fresco. Podem atuar como quelantes de metais, reduzindo a oxidação, a exemplo do ácido cítrico, preservativos como ácido benzóico e ácido sórbico podem ser utilizados em margarinas com baixo teor de gordura, mas seguem legislação específica de cada país (BOCKISCH, 1998).

Antioxidantes podem ser classificados de acordo com a sua solubilidade em hidro ou lipossolúveis. Se a água é a fase contínua da emulsão, antioxidantes solúveis em água podem ser adicionados diretamente no sistema em apenas uma etapa. No entanto, antioxidantes lipossolúveis precisam ser previamente dissolvidos na fase oleosa, o qual requer solvente orgânico para diluição e dispersão. Neste caso é necessária a remoção do solvente (LIU; YANG, 2008).

Em sistemas alimentícios com baixa razão superfície-volume (óleos vegetais), antioxidantes polares com alto balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), como propil galato (PG), TBHQ (tercbutilhidroquinona) e Trolox C, são mais efetivos do que antioxidantes apolares lipofílicos, como BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e tocoferóis. Em contraste, alimentos com alta razão superfície-volume (ex: óleos emulsificados), antioxidantes lipofílicos com baixo BHL são mais favorecidos (PORTER et al., 1989). Este tipo de comportamento ficou conhecido como ‘paradoxo polar’, no qual antioxidantes polares são mais efetivos em lipídios não polares, enquanto antioxidantes não polares são mais ativos em emulsões lipídicas polares (HOPIA et al., 1996; MOURE et al., 2001).

A oxidação lipídica de emulsões é influenciada por diversos fatores, os quais podem ser controlados através de diversas medidas como, por exemplo: controle das membranas das gotículas, as gotículas das emulsões são cercadas pelos emulsificantes e estas servem de proteção a oxidação, pois atuam como barreira a penetração e difusão de moléculas iniciadoras de oxidação; no uso de antioxidantes, a polaridade deve ser levada em consideração; controle de oxigênio, através do uso de embalagens; particionamento de reagentes e produtos, alterando o teor de gordura nos produtos; composição da gotícula de óleo, proporção de ácidos graxos insaturados e saturados (COUPLAND; MCCLEMENTS, 1996; GENOT et al., 2003).

Vários estudos têm mostrado que diferentes matérias primas vegetais podem ser efetivas na proteção contra a oxidação de emulsões, como exemplo o extrato aquoso das flores de quatro variedades de Harnng Jyur foram testados quanto a capacidade antioxidante em emulsões de óleo de soja do tipo água em óleo e óleo em água (DUH,

1999). O estudo mostrou que as emulsões contendo os extratos naturais foram mais estáveis do que o controle, sem adição de antioxidantes.

No estudo de Moure e colaboradores (2007), extrato da casca da amêndoa (*Prunus amygdalus*) apresentou atividade antioxidante quando adicionado em emulsão de óleo de peixe comparável a proteção proporcionada pelo ácido gálico.

Abdalla e Roozen (1999) testaram a atividade antioxidante de 6 extratos de plantas (erva de gato, hissopo, erva-cidreira, orégano, sálvia e tomilho) na proteção de emulsão 20% óleo em água. Todos os extratos apresentaram proteção contra a oxidação, a erva de gato apresentou proteção com maior eficiência que o antioxidante padrão BHT.

O extrato de *Eugenia pollicina* inibiu a autooxidação de emulsão de azeite de oliva e óleo de soja a 30% óleo em água e foi efetivo na diminuição da formação de hidroperóxidos nas emulsões durante 13 dias de armazenamento a 40 °C (RAMFUL et al., 2011).

De acordo com a legislação brasileira são permitidos a adição em margarinas de 100 mg/kg de BHT, 200 mg/kg de BHA, TBHQ, EDTA e galato de propila, 300 mg/kg de tocoferol ou mistura concentrada de tocoferóis. Outros como: ácido cítrico, eritorbato de sódios e outros, são permitidos em quantidade suficiente (BRASIL, 1997).

As vitaminas são adicionadas pelas características alimentícias dos produtos (principalmente A, D e E) (DORSA, 2004). A fortificação obrigatória de margarina com a vitamina A é realizada pela adição de  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A) e/ou ésteres de vitamina A. O nível de caroteno é ajustado para a cor desejada e os ésteres incolores (palmitato, acetato, etc) são usados para padronizar o teor de vitamina. A adição de vitamina D é opcional. A margarina é colorida com carotenóides, e sintéticos de  $\beta$ -caroteno são os mais amplamente utilizados. O caroteno dissolve muito lentamente em óleo, portanto o composto é pulverizado e os microcristais são suspensos em óleo para retardar a oxidação. Extratos naturais que contenham carotenóides, por exemplo, anato (bixina), óleo de cenoura, e óleo de palma também têm sido utilizados (CHRYSAN, 2005).

O uso de flavorizantes difere entre os países, de acordo com as preferências locais (BOCKISCH, 1998). Muitos sabores sintéticos de manteiga estão disponíveis para uso em margarinas. Estas são baseadas geralmente em misturas de compostos que tenham sido identificados como contribuindo para o sabor de manteiga, tais como lactonas, ésteres etílicos de cadeia curta de ácidos graxos, cetonas, e aldeídos. Diacetil é

um constituinte primário volátil de margarina e contribui significativamente para um aroma amanteigado (CHRYSAN, 2005). Os corantes são adicionados para que a margarina tenha aspecto mais próximo ao da manteiga (DORSA, 2004).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997 determina o *Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de margarinas* e cita como características sensoriais o aspecto, que deve ser uma emulsão plástica ou fluida, homogênea, uniforme; a cor deve ser amarela ou branca amarelada e homogênea; o sabor e odor característico ou de acordo com os ingredientes de sua composição. Cita como características físico-químicas, os lipídios totais, com teor máximo de 95%. Para a condição de conservação a margarina deve ser conservada e comercializada em temperatura não superior a 16°C, salvo para o produto cujos ingredientes, segundo um sistema de análise de risco, requeiram temperatura inferior ou superior a 16° C (BRASIL, 1997).

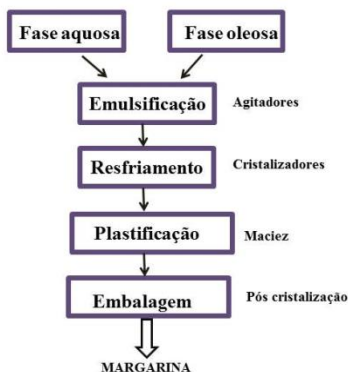
### **1.5.2 Etapas de produção**

Ao projetar plantas de processamento de margarinas e escolher os equipamentos a serem instalados, uma vasta gama de considerações devem ser feitas em relação aos problemas como o processamento, a higiene, o saneamento e a eficiência. Na produção de margarinas, óleos e gorduras são considerados as matérias primas mais importantes utilizadas (ALEXANDERSEN, 2005). Os tipos de óleos ou gorduras utilizados devem ser considerados quando se escolhe o equipamento da linha de processamento. Os critérios envolvidos na escolha deste equipamento são em certa medida, com base no conhecimento sobre as características do produto, teor de sólidos, polimorfismo e estrutura cristalina da margarina (ALEXANDERSEN, 2005; CHRYSAN, 2005).

O processo básico que consiste na misturada fase oleosa e fase aquosa, emulsificação, resfriamento, plastificação e embalagem, podem ser observados na Figura 10 (BOCKISCH, 1998).

Figura 10 Etapas gerais de produção de margarinas.





Fonte: Adaptado de Bockisch (1998).

A fase aquosa é preparada através da solubilização dos ingredientes solúveis em água tais como ácido cítrico, vitaminas solúveis em água, benzoato de sódio, sorbato de sódio entre outros, de forma descontínua, em batelada. A fase oleosa é composta de óleos e gorduras, além de outros ingredientes solúveis em óleos como emulsificantes, estabilizantes, lecitina, vitaminas e corantes. As gorduras utilizadas para as margarinas são obtidas naturalmente, origem animal ou vegetal, ou podem ser produzidas a partir de processos de hidrogenação ou interesterificação de óleos (BOCKISCH, 1998; DORSA, 2004; CHRYSAN, 2005; ORDONEZ et al., 2007).

A fase aquosa passa por uma pasteurização prévia, seguida de pré-aquecimento. Uma vez formuladas as fases, ambas são adicionadas em um tanque de emulsificação, dotado de camisa de água quente e agitação, com temperatura em torno de 43 a 49 °C. Se a temperatura não for adequada, pode haver a formação de nucleação de cristais e de estruturas pré-cristalinas que podem afetar a consistência do produto acabado. Para ocorrer a emulsificação da fase aquosa e oleosa, elas precisam ser misturadas cuidadosamente. A emulsificação é possível devido a presença dos emulsificantes, que a mantêm estáveis (BOCKISCH, 1998; CHRYSAN, 2005; DORSA, 2004).

O resfriamento das margarinas é feito em resfriadores de superfície raspada com expansão direta de amônia, alimentados por bomba de alta pressão. Para se obter uma excelente cristalização, a qual se inicia nesta etapa, é conveniente aquecer previamente o produto em um trocador de calor de placas a 68°C e em seguida resfria-lo até

aproximadamente 45°C para evitar a sobrecarga do resfriador final. Isto propicia ainda uma ‘pasteurização’ do produto garantindo sua qualidade e vida de prateleira. O produto bombeado com uma bomba de pistões de alta pressão é resfriado até aproximadamente 12°C no resfriador de superfície raspada, temperatura na qual é plastificado e bombeado. Para melhor homogeneidade na cristalização do produto, o resfriamento deve ser feito em duas etapas (DORSA, 2004).

O equipamento de plastificação é uma bateadeira dotada de eixo com pinos espaçados dispostos em espiral e sua carcaça dotada de pinos fixos alinhados. Tem como função tornar a margarina fluida e cremosa (plástica) (DORSA, 2004). A formação de cristais nesta unidade de trabalho depende do tempo de residência (volume e rendimento) e da velocidade de rotação do eixo, bem como a velocidade de cristalização da gordura (CHRYSAN, 2005). Esta etapa se faz necessária pois em margarinas de mesa, acondicionadas em potes plásticos, a cristalização final se dá dentro do pote (DORSA, 2004).

A margarina é imediatamente embalada após deixar a unidade de processamento, o material confere proteção durante o transporte, vida de prateleira e uso (BOCKISCH, 1998) e depende do tipo de margarina, consistência do produto e da preferência do consumidor (ALEXANDERSEN, 2005). As embalagens mais usuais para margarinas de mesa são potes plásticos e o papel parafinado aluminizado. No primeiro caso é indispensável a utilização de um plastificador, e no segundo caso utiliza-se um tubo cristalizador para que a margarina adquira consistência dura e permita este tipo de embalagem. Margarinas industriais são embaladas em sachês plásticos, latões ou sacos plásticos (DORSA, 2004).

Nos Estados Unidos, prazos de validade com datas estampadas em margarinas são de geralmente 6 a 12 meses a contar da data de fabricação. Alguns produtos de menor teor de gordura são dadas apenas uma vida de prateleira de 4 meses. Os produtos de mesa geralmente são distribuídos e comercializados sob refrigeração. Quando em temperatura mais elevada o produto é mais susceptível a descoloração, perda de sabor, problemas com textura e crescimento fúngico. Em alguns lugares não é incomum que os produtos de margarina fiquem fora da refrigeração durante certos períodos. Isso pode levar a recristalização de glicerídeos com ponto de fusão mais elevado e um aumento no ponto de fusão. Do ponto de vista sensorial, isso resulta em uma sensação mais pesada sobre o paladar e liberação de sal. A embalagem desempenha um papel significativo na manutenção da qualidade do produto. Se a margarina é embalada em tubos plásticos ou garrafas que transmitem

luz, ou que tenham armazenamento sob luz fluorescente pode causar o desenvolvimento de sabores estranhos dentro de dias. Os produtos que contêm óleo de soja, de canola ou outros óleos com um elevado teor de ácido linolênico são particularmente suscetíveis ao desenvolvimento de sabores e aromas indesejáveis (CHRYSAN, 2005).

## **1.6 Métodos para avaliação da oxidação**

Vários métodos instrumentais e químicos têm sido propostos através dos anos para avaliar a qualidade e estabilidade de óleos e gorduras. Normalmente, os métodos estão baseados na medida de um ou mais produtos da oxidação primária e secundária, ou propriedades físicas e químicas resultantes destas modificações. A utilidade de cada procedimento depende de vários fatores, também deve ser levado em consideração se os dados fornecidos pelo método se correlacionam com as propriedades sensoriais de óleos e gorduras (WARNER; ESKIN, 1995).

Métodos que medem a estabilidade oxidativa em diferentes graus podem apresentar vantagens e desvantagens. Observa-se que cada método pode apenas determinar informações de concentração do composto correspondente ou grupo de compostos em diferentes momentos durante o processo de oxidação (GUILLEN; CABO, 2002). Não existe um método padrão para detectar todas as mudanças oxidativas em todos os alimentos lipídicos (SHAHIDI; ZHONG, 2005).

### **1.6.1 Índice de estabilidade de óleos - Osi (*Oil Stability Index*)**

Um método frequentemente utilizado no passado era o Método do Oxigênio Ativo (AOM), no entanto, este método demanda muito tempo. Outra desvantagem deste método é que as medições deveriam ser realizadas em intervalos de tempos, resultando em uma determinação imprecisa do período de indução. Um substituto automático do AOM é o Índice de Estabilidade do Óleo (*Oil Stability Index*) um método oficial da *American Oil Chemists' Society* (AOCS - 2004). Em contraste com o AOM, que mede o índice de peróxido do óleo, o OSI determina os voláteis do óleo, onde uma sonda mede continuamente a condutividade devido ao aumento de ácidos orgânicos conforme procede a autooxidação (COPPIN; PIKE, 2001; SHAHIDI; ZHONG, 2005; FARHOOSH, 2007). Dois instrumentos comerciais estão disponíveis, são eles o

Rancimat® (Metrohm, Herisau, Suíça) e o Instrumento de Estabilidade Oxidativa® (Omnion, ADM, Rockville, MD) (COPPIN; PIKE, 2001).

### 1.6.2 Índice de *p*-Anisidina

Muitos dos compostos considerados responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis em óleos são aldeídos (principalmente 2-alquenais e 2,4 alcadienais), gerados durante a decomposição de hidroperóxidos. O procedimento analítico para determinar o índice de *p*-anisidina promove a reação entre  $\alpha$  e  $\beta$ -aldeídos com o reagente de *p*-anisidina. Quando a reação acontece em solução de ácido acético, o produto resultante cria uma cor amarela possível de ser medida em 350 nm. A cor é quantificada e convertida em índice de *p*-anisidina. O teste é mais sensível para aldeídos insaturados do que saturados, pois a cor produzida pelo insaturado absorve mais intensamente neste comprimento de onda. É uma medida confiável da rancidez oxidativa de óleos e gorduras. Óleos com altas taxa de ácidos graxos poli-insaturados, podem ter valores altos de anidisina mesmo quando novos (WARNER; ESKIN, 1995; SHAHIDI; ZHONG, 2005).

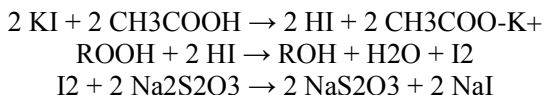
### 1.6.3 Índice de peróxidos

Os produtos iniciais da oxidação lipídica são os hidroperóxidos, geralmente referidos como peróxidos. Portanto, a determinação de sua concentração é uma forma de mensurar a extensão da oxidação. Mas esta teoria é limitada, devido a sua natureza transitória ou instabilidade nas quais são formados, o teor alcança um valor máximo, mas que é muito instável a temperatura; por isso tendem a se desintegrar após sua formação nestas condições. Peróxidos são produtos intermediários que levam a formação dos verdadeiros produtos de rancidez como os compostos voláteis. Devido a esta natureza, não indicam a atual natureza do estado oxidativo, mas é um índice muito utilizado para determinações iniciais de oxidação (GRAY, 1985; ARAGÃO et al., 2008).

O índice de peróxido é uma metodologia para determinação dos produtos de oxidação primária em óleos e gorduras. O método de titulação amplamente utilizado (AOCS Method Cd 8-53) para determinação do índice de peróxidos é baseado na medição do iodo produzido pelo iodeto de potássio através dos peróxidos presentes e o resultado é expresso como miliequivalentes de iodo por kg de lipídio

(meq/kg) (KULAS; ACKMAN, 2001). O princípio da determinação iodométrica de peróxido é apresentado na Figura 11.

Figura 11 Determinação iodométrica de peróxido.



Fonte: Warner e Eskin (1995).

#### 1.6.4 Valor Totox

O valor Totox é a medida da oxidação total, incluindo produtos de oxidação primária e secundária. É a combinação do índice de peróxido e índice de *p*-anisidina (Equação 2):

$$\text{Valor Totox} = 2 \text{ índice peróxido} + \text{índice de } p\text{-anisidina} \quad (2)$$

Durante a oxidação lipídica primeiramente é observado um aumento no índice de peróxidos, e posteriormente uma queda devido a decomposição dos hidroperóxidos. O índice de peróxido e índice de *p*-anisidina refletem o nível de oxidação no início e fases posteriores da reação respectivamente. O valor Totox mede tanto hidroperóxidos quanto os produtos da degradação e fornece uma estimativa da progressiva deterioração oxidativa de óleos e gorduras. No entanto, este valor não tem base científica, pois é uma combinação de 2 indicadores com diferentes dimensões (SHAHIDI; ZHONG, 2005).

#### 1.6.5 Dienos e trienos

Durante a formação de hidroperóxidos a partir de ácidos graxos insaturados, dienos conjugados são tipicamente produzidos, através do rearranjo das duplas ligações. Os dienos conjugados resultantes exibem uma intensa absorção a 234 nm, da mesma forma trienos conjugados (produtos secundários de oxidação) absorvem a 268 nm, como cetodienos e dienais. Um aumento na absorção UV teoricamente reflete na formação de produtos primários de oxidação em óleos e gorduras. Uma boa relação entre dienos conjugados e índice de peróxido é encontrada, pois o aumento do índice de peróxidos ocorre em paralelo

ao incremento da absorção de UV pelos dienos conjugados. A detecção ultravioleta de dienos conjugados é simples, rápida, não requer reagentes químicos e apenas uma pequena quantidade de amostra é exigida. No entanto, este método tem menos especificidade e sensibilidade do que a medida de peróxido (KULAS; ACKMAN, 2001; SHAHIDI; ZHONG, 2005).

### **1.6.6 Perfil de ácidos graxos**

A determinação das mudanças na composição de ácidos graxos é útil para a identificação dos ácidos graxos envolvidos nas reações de oxidação. Mas a aplicação deste método é limitado, devido a incapacidade para servir de indicador da oxidação de lipídios mais saturados. No entanto, a sua utilidade para a medição de oxidação de óleos altamente insaturados não pode ser menosprezada (SHAHIDI; ZHONG, 2005). A cromatografia gasosa tem sido utilizada para a determinação de ácidos graxos. Antes das amostras serem injetadas na coluna cromatográfica, é necessária uma preparação da amostra, a derivatização, onde são obtidos ésteres metílicos ou etílicos (GONÇALVES, 2009).

## **1.7 Outros métodos para avaliação da qualidade de margarinas**

### **1.7.1 Índice de acidez**

O índice de acidez determina a quantidade de ácidos graxos livres em uma gordura. Normalmente, a amostra dissolvida em solvente (ex: etanol/éter), é tratada com uma solução de hidróxido de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com adição de fenolftaleína. Em prática, o hidróxido de potássio pode ser substituído por hidróxido de sódio (BOCKISCH, 1998).

### **1.7.2 Ponto de fusão**

Considera-se como ponto de fusão de uma gordura o ponto de fusão da forma polimórfica mais estável ( $\beta$ ) em capilar aberto, correspondendo a temperatura na qual todos os sólidos se fundem. A presença de ácidos graxos de cadeia curta ou insaturados tende a baixar o ponto de fusão, por isso, os óleos vegetais ricos em ácidos graxos insaturados, são líquidos a temperatura ambiente, enquanto a gordura

animal, mais saturada, apresenta-se como sólida na mesma temperatura. O método mais utilizado para determinação do ponto de fusão é o de capilar aberto, onde as amostras são condicionadas em capilares e congeladas por um tempo fixo. Através de aquecimento, se faz a determinação da temperatura onde, a amostra se move pelo capilar, passando de opaco a transparente, o que representa a energia liberada necessária para a fusão da amostra (ORDÓÑEZ, et al., 2007; GONÇALVES, 2009).

### **1.7.3 Análise de cor**

A cor é um dos atributos de qualidade importantes em alimentos. Embora não reflita necessariamente, valores nutricionais, funcionais ou de sabor, pode determinar a aceitabilidade do produto pelos consumidores. Às vezes, ao invés de uma análise química, a medição de cor pode ser utilizada se existir uma correlação do componente da cor e do produto químico presente no alimento. Pode ser necessário acompanhar as alterações de cor do produto durante o armazenamento, maturação, processamento e assim por diante. A cor é um fenômeno perceptivo que depende do observador e das condições no qual é observado. É uma característica da luz, que é mensurável em termos de intensidade e comprimento de onda. A cor de um material se torna visível quando a luz de uma fonte luminosa atinge a superfície do objeto (SAHIN; SUMNU, 2006).

O olho humano é um observador definidor de cor. Pode determinar aproximadamente 10 milhões de cores, o que não é possível para os instrumentos. Alguns acreditam que o olho é o observador mais importante e argumentam que as análises de cor podem ser feitas apenas por correspondências visuais com cartões de cor. No entanto, essa percepção é diferente e varia entre os indivíduos. Sendo assim, métodos instrumentais de medição de cor foram desenvolvidos (SAHIN; SUMNU, 2006).

Instrumentos de medição de cor são divididos em 2 tipos: espectrofotométricos e colorimétricos. O espectrofotométrico se baseia na reflexão ou absorção em espectrofotômetro. Os colorimétricos surgiram para facilitar os cálculos dos métodos espectrofotométricos e se dá através do uso de filtros específicos, se faz necessário o uso de padrões para comparação (SAHIN; SUMNU, 2006).

O método de medição de cor CIELAB foi desenvolvido em 1976, pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE) e oferece mais

vantagens que o sistema de cor CIE desenvolvido em 1931. É mais uniforme e baseado em cores mais usuais e aceitas, descrevendo uma teoria de cores opostas. A localização de qualquer cor no espaço CIELAB é determinada pelas subcoordenadas de cor  $L^*$ : diferença de luz ( $L^*=100$ =luz) e ( $L^*=0$ =escuro); o componente  $a^*$  representa a diferença entre o verde ( $-a^*$ ) e vermelho ( $+a^*$ ); o componente  $b^*$  representa a diferença entre azul ( $-b^*$ ) e amarelo ( $+b^*$ ). Se todos estes componentes são conhecidos, a cor não é apenas descrita, mas localizada no espaço (SAHIN; SUMNU, 2006).



## REFERÊNCIAS

ABDALLA, A.E; ROOZEN, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 323-329, 1999.

AL-BANDAK, G; DERMESONLOUGLOU, E.K; TAOUKIS, P.S; OREOPOULOU, V. Antioxidant effect of *Majorana syriaca* extract in bulk corn oil and o/w emulsion after applying high hydrostatic pressure. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p.1166–1170, 2011.

ALEXANDERSEN, K.A. Margarine Processing Plants and Equipment. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6.ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

ANDREO, D; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ARAGÃO, G.M.F; CORRADINI, M.G; PELEG, M. A phenomenological model of the peroxide value's rise and fall during lipid oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 12, p. 1143-1153, 2008.

ATTWOOD, D. Sistemas dispersos. In: AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. Edição. Artmed, Porto Alegre, 2006.

AZIZKHANI, M; ZANDI, P. Effects of some natural antioxidants mixtures on margarine stability. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 49, p. 93-96, 2009.

AZIZKHANI, M; ZANDI, P. Effects of Some Natural Antioxidants Mixtures on Margarine Stability. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 47, n. 3, p. 251-257, 2010.

AZIZKHANI, MARYAM; KAMKAR, ABOLFAZL, NEJAD, AMIR SASAN MOZAFFARI. Effects of tocopherols on oxidative stability of margarine. **Journal of Chemical Society of Pakistan**; v. 33, n.1, p. 134-137, 2011.

BABOVIĆ, N; ŽIŽOVIĆ, I; SAIČIĆ, S; IVANOVIĆ, J; PETROVIĆ, S. Oxidative estabilisation of sunflower oil by antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 16, n. 4, p. 287–293, 2010.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K; SAMMAN S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BASAGA, H; TEKKAYA, C; ACIKEL, F. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. **LWT Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 105–108, 1997.

BATISTA, R.B; OLIVEIRA, M.G.A; PIRES, C.V; LANNA, A.C; GOMES, M.R.A; JOSÉ, I.C; PIOVESAN, N.D; REZENDE, S.T; MOREIRA, M.A. Efeito da aplicação foliar de ácidos graxos na ‘Via das lipoxigenases’ de plantas de soja. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 914-920, 2002.

BELHAJ, N; ARAB-TEHRANY, E, LINDER, M. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 187–195, 2010.

BEYDOUN, D; GUANG, D; CHABRA, R.P; RAPER, J.A. Particle settling in oil-in-water emulsions. **Powder Technology**, v.97, n. 1, p.72-76, 1998.

BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. Introdução a química de alimentos. 2 Edição, Livraria Varela Ltda, São Paulo, 1989.

BOCKISCH, M. Fat and oils Handbook. 1. Edição. AOCS Press, USA, 1998.

BLOCK, J.M; BARRERA-ARELLANO, D. Composition and stability of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] kernels and oil. In: TOMÁS, MABEL CRISTINA. Advances in fats and oils research. 1. Ed. India, Trans World Research Network, 2010.

BLOCK, J.M; BARRERA-ARELLANO, D. Temas selectos en aceites y grasas, volume 2, capítulo 1. 1 Edição, Editora Blucher, São Paulo, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997. *Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de margarinas*. Brasília: Diário Oficial da União, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br), acesso em 28 de junho de 2012.

BUBONJA-SONJE, M; GIACOMETTI, J; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and Rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1821–1827, 2011.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable oil emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2-3, p. 125–155, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterocíclicos. In: SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, G.G.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed., Porto Alegre /Florianópolis, Ed. Universidade/UFGRS/ Ed. da UFSC, 2007.

CHOE, E; MIN, D.B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. **Comprehensive reviews in food Science and food safety**, v.8, n. 4, p. 345-358, 2009.

CHRYSAN, MICHAEL M. Margarine and Spreads. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

CHU, Y.H; HSU, H.F. Effects of antioxidants on peanut oil stability. **Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 29-34, 1999.

CODEx ALIMENTARIUS,  
<http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/index.html>, acesso em 15/02/2013.

COPPIN, E.A; PIKE, O.A. Oil Stability Index Correlated with Sensory Determination of Oxidative Stability in Light-Exposed Soybean Oil. **JAACS**, v. 78, n. 1, p. 13-18, 2001.

COULTATE, T.P. Alimentos: a química de seus componentes. 3. Ed. Editora Artmed, 2004.

COUPLAND, J.N; MCCLEMENTS, D.J. Lipid oxidation in food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 3, p. 83-91, 1996.

COUPLAND, J.N. Crystallization in emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, n. 5-6, p. 445–450, 2002.

DALGLEISH, D.G. Adsorption of protein and the stability of emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 1997.

DICKINSON, E; RITZOULIS, C; YAMAMOTO, Y; LOGAN, H. Ostwald ripening of protein-stabilized emulsions: effect of transglutaminase crosslinking. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.12, n. 3-6, p. 139–146, 1999.

DORSA, R. Tecnologia de óleos vegetais. 1. Edição, Editorial Ideal, Campinas, 2004.

DOOLAEGE, E.H.A; VOSSEN, E; RAES, K; DE MEULENAER, B; VERHE, R; PAELINCK, H; DE SMET, S. Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidante concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. **Meat Science**, v. 90, n. 4, p. 925–931, 2012.

DUH, P.D. Antioxidant activity of water extract of four Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) varieties in soybean oil emulsion. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 471-476, 1999.

ERKAN, N; AYRANCI, G; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 76 – 82, 2008.

FARHOOSH, R. The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 3, p. 205-209, 2007.

FARHOOSH, R; EINAFSHAR, S; SHARAYEI, P. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 933–938, 2009.

FARMER, E.H; BLOOMFIELD, G.F; SUNDRALINGAM, A; SUTTON, D.A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. **Transactions of the Faraday Society**, London, v. 38, p. 348-358, 1942.

FILIP, V; HRADKOVA, I; SMIDRKAL, J. Antioxidants in margarine emulsions. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. s9-s11, 2009.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S-W; KANNER, J; GERMAN, J.B. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n. 5, p.1054-1059, 1994.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n.1, p.51-55, 1996.

FRANKEL, EDWIN N; HUANG, SHU-WEN; PRIOR, ELIZABETH; AESCHBACH, ROBERT. Evaluation of antioxidant activity of Rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, n. 2, p. 201-208, 1996.

FRUTOS, M.J; HERNANDEZ-HERRERO, J.A. Effects of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on the stability of bread with an oil, garlic and parsley dressing. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 651-655, 2005.

GENOT, C; MEYNIER, A; RIAUBLANC, A. Lipid oxidation in emulsions. In: KAMAL-ELDIN, A. Lipid oxidation pathways. 1. ed, EUA, AOCS Press, 2003.

GIBIS, M; WEISS, J. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 766-774, 2012.

GONÇALVES, LIRENY APARECIDA GUARALDO. Análisis de Lípidos: uma visão prática. In: BLOCK, J.M; BARRERA-ARELLANO, D. Temas selectos em Aceites y Grasas, volume 1 - Procesamiento. 1. Edição, v.1, São Paulo-SP, Editora Edgard Blucher Ltda, 2009.

GRAMZA-MICHALOWSKA, A; HES, MARZANNA; KORCZAK, J. Tea extracts antioxidative potencial in emulsified lipid systems. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**; v. 7, n.3, p. 29-34, 2008.

GRAY, J. I. Simple chemical and physycal methods for measuring flavor quality of fats and oils. In: MIN, D.B. e SMOUSE, T.H. (Eds.) Sabor chemistry of fats and oils. **American Oil Chemistry Society**, p. 223-239, 1985.

GUILLEN, M.D; CABO, N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. **Food Chemistry**, v.77, n. 4, p. 503–510, 2002.

HO, C.T; SHAHIDI, F. Flavor componentes os fat and oils. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

HOPIA, A.I; HUANG, S.W; SCHWARZ, K; GERMAN, J.B; EDWIN, N. Effect of Different Lipid Systems on Antioxidant Activity of Rosemary Constituents Carnosol and Carnosic Acid with and without  $\alpha$ -Tocopherol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2030-2036, 1996.

HRAS, A.R; HADOLIN, M; KNEZ, Z; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of Rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil.**Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 229-233, 2000.

IQBAL, S; BHANGER, M.I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 246–254, 2007.

IQBAL, S; HALEEM, S; AKHTAR, M; ZIA-UL-HAQ, M; AKBAR, J. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunfloweroil under accelerated conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 194–200, 2008.

JIANG, Y; WU, N; FU, Y.J; WANG, W; LUO, M; ZHAO, C.J; ZU, Y.G; LIU, X.L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68, 2011.

JUSTO, O.R; MORAES, A.M; BARRETO, G.P.M; MERCADANTE, A.Z; ROSA, P.T.V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

KAMAL-ELDIN, A; MAKINEN, M; LAMPI, A.N. The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism. In: KAMAL-ELDIN, A. Lipid oxidation pathways. 1. ed, EUA, AOCS Press, 2003.

KIOKIAS, S; DIMAKOU, C; OREOPOULOU, V. Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1278–1284, 2009.

KODALI, D. R. Trans fats – Chemistry, Ocurrence, Functional Need in Foods and Potential Solutions. In: KODALI, D. R.; LIST, G. R. **Trans fats Alternatives**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2005. 132 p.

KULAS, E; ACKMAN, R.G. Different Tocopherols and the Relationship between Two Methods for Determination of Primary Oxidation Products in Fish Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v.49, n. 4, p. 1724-1729, 2001.

LAGUERRE, M; LECOMTE, J; VILLENUEVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244–282, 2007.

LA ROSA, LAURA A; ALVAREZ-PARRILLA, EMILIO; SHAHIDI, FEREIDOON. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican Pecan (*Carya illinoensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 152-152, 2011.

LIU, T.T; YANG, T.S. Effects of Water-Soluble Natural Antioxidants on Photosensitized Oxidation of Conjugated Linoleic Acid in an Oil-in-Water Emulsion System. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 256-261, 2008.

MARIUTTI, L.R.B; BARRETO, G.P.M; BRAGAGNOLO, N; MERCADANTE, A.Z. Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Extracts from Herbs and Spices Commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1225-1232, 2008.

MCCLEMENTS, D.J; DECKER, E.A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1270-1282, 2000.

MCCLEMENTS, D.J. The rheology of emulsion-based food products. In: MCKENNA, B.M. Texture in food. Volume 1: Semi-solid foods. 1. ed., Inglaterra, Woodhead Publishing Ltda, , 2003.

MCCLEMENTS, D.J; WEISS, J. Lipid Emulsions. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

MOURE, A; CRUZ, J.M; FRANCO, D; DOMINGUES, J.M; SINEIRO, J. DOMINGUES, H; NUNEZ, M.J; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

MOURE, A; PAZOS, M; MEDINA, I; DOMINGUES, H; PARAJO, J. C. Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of



almond shells acid hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 193–201, 2007.

MULLER, L.G; PASE, C.S; RECKZIEGEL, P; BARCELOS, R.C.S; BOUFLEUR, N; PRADO, A.C.P; FETT, R; BLOCK, J.M; PAVANATO, M.A; BAUERMANN, L.F; ROCHA, J.B.T; BURGER, M.E. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n.1-2, p. 165-171, 2013.

OETTERER, M; REGITANO-D'ARCE, M.A.B; SPOTO, M.H.F. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. 1. edição, Editora Manole Ltda, Barueri - SP, 2006.

**Official Journal of the European Union.** REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N. o 344/2011 DA COMISSÃO de 8 de Abril de 2011. Páginas: L 96/15 e L 96/16, Data: 9.4.2011.

OLUWATUYI, MOYOSOLUWA; KAATZ, GLENN W; GIBBONS, SIMON. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 24, p. 3249–3254, 2004.

ORDONEZ, J.A; RODRIGUES, M.I.C; ALVAREZ, L.F; SANZ, M.L.G; MINGUILLON, G.D.G.F; PERALES, L.H; CORTECERO, M.D.S. Tecnologia de alimentos, v.1 - Componentes dos alimentos e processos. 1 edição, Artmed Editora S.A; Porto Alegre - RS, 2007.

OZCAN, M. Use of própolis extract as a natural antioxidante of plant oils. **Grasas y Aceites**, v. 51, fasc. 4, p. 251-253, 2000.

PATINO, J.M.R; NINO, M.R.S. Interfacial characteristics of food emulsifiers (proteins and lipids) at the air-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 15, n. 3-4, p. 235–252, 1999.

PORTER, W.L; BLACK, E.D; DROLET, A.M. Use of Polyamide Oxidative Fluorescence Test on Lipid Emulsions: Contrast in Relative Effectiveness of Antioxidants in Bulk Versus Dispersed Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v.37; n. 3, p. 615-624, 1989.

PRADO, A.C.P; ARAGÃO, A.M, FETT, R; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**; v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009a.

PRADO, A.C.P; ARAGAO, A.M; FETT, R; BLOCK, J.M. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. **Grasas y Aceites**, v. 60, fasc. 4; p. 330-335, 2009b.

PRADO, A.C.P; ARAGAO, A.M; FETT, R; BLOCK, J.M. Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts. **Grasas y Aceites**, v. 60, fasc. 5, p. 458-467, 2009c.

PRADO, A.C.P; MANION, B.A; SEETHARAMAN, K; DESCHAMPS, F.C; ARELLAMO, D.B; BLOCK, J.M. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64-73, 2013.

PRADO, A.C.P. **Identificação e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (wangenh) C. Koch]**, 2013, 244 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2013].

PRADO, A.C.P; SILVA, H.S; SILVEIRA, S.M; VIEIRA, C.R.W; MARASCHIN, M; FERREIRA, S.R.S; BLOCK, J.M. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. **Industrial Crops & Products**, v. 52C, p. 552-561, 2014.

RAMALHO, V.C; JORGE, N. ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EM ÓLEOS, GORDURAS E ALIMENTOS GORDUROSOS. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMFUL, D; AUMJAUAD, B; NEERGHEEN, V.S; SOOBRALEE, M.A; GOOGOLUE, K; ARUOMA, O.I; BAHORUN, T. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro

and in model emulsion systems. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1190–1196, 2011.

RECKZIEGEL, P; BOUFLEUR, N; BARCELOS, R.C.S; BENVENU, D.M; PASE, C.S; MULLER, L.G; TEIXEIRA, A.M; ZANELLA, R; PRADO, A.C.P; FETT, R; BLOCK, J.M; BURGER, M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1770–1778, 2011.

REDA, S.Y; CARNEIRO, P.I.B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, n. 27, fev-mar, 2007.

RIBEIRO, A.P.B; MOURA, J.M.L.N; GRIMALDI, R; GONÇALVES, L.A.G. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1295-1300, 2007.

ROUSSEAU, D. Fat crystals and emulsion stabilit – A review. **Food Research International**, v. 33, n. 1, p. 3-14, 2000.

SAHIN, S; SUMNU, S.G. Physical Properties of Foods. 1. Ed. Springer Science Business Media, New York, USA, 2006.

SAMOTYJA, U; MALECKA, M. Effects of blackcurrant seeds and Rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 317-323, 2007.

SCHAICH, K.M. Lipid oxidation: Theoretical aspects. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

SCRIMGEOUR, C. Chemistry of Fatty Acids. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

SEBRANEK, J.G; SEWALT, V.J.H; ROBBINS, K.L; HOUSER, T.A. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, v. 69, n. 2, p. 289-296, 2005.

SHAHIDI, F; MIRALIAKBARI, H. Tree nut oils. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Antioxidants: Regulatory Status. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

SHAKER, E.S. Antioxidative effect of extracts from red grape seed and peelon lipid oxidation in oils of sunflower. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 883–892, 2006.

SILVA, F.A.M; BORGES, M.F.M; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SKEAFF CM. Feasibility of recommending certain replacement or alternative fats. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. s34-s49, 2009.

STAUFFER, C.E. Emulsifiers of the food industry. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

TERPINC, P; BEZJAK, M; ABRAMOVIC, H. Kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 740–744, 2009.

TIRONI, V.A; TOMAS, M.C; ANON, M.C. Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudopercis semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 263-272, 2010.

VALENZUELA, A. B.; NIETO S. K. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. **Grasas y aceites**, v. 47, fasc. 3, p. 186-196, 1996.

VAN NIEUWENHUYZEN, W; SZUHAJ, B.F. Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions. **Fett/Lipid**, v. 100, n. 7, p. 282–291, 1998.

VILLARREAL-LOZOYA, J.E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v.102, n. 4, p. 1241-1249, 2007.

ZAMORA, R; HIDALGO, F.J; ALALZ, M. Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. I. Formación de los hidroperóxidos lipídicos. **Grasas y aceites**, v. 42, fasc. 3, p. 155-162, 1991.

WANASUNDARA, P.K.P.D. e SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects*. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – interscience, 2005.

WAHARO, T; McCLEMENTS, D.J; DECKER, E.A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.

WARNER, K; ESKIN, N.A.M. Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods. Champaign, USA: AOCS Press, 1995.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In: SANTERRE, C. R; Pecan technology. New York: Chapman & Hall, p. 39-45, 1994.

WU, X; BEECHER, G.R; HOLDEN, J.M; HAYTOWITZ, D.B; GEBHARDT, S.E; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidante capacities of commom foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, 4026-4037, 2004.

YOSR, Z; HNIA, C; RIM, T; MOHAMED, B. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 412 – 419, 2013.

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE OXIDATIVA DE MARGARINAS ADICIONADAS DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ-PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] E DE ALECRIM [*Rosmarinus Officinallis*]**

## RESUMO

Várias pesquisas indicam efeitos indesejáveis sobre a saúde causados pela adição de antioxidantes sintéticos em alimentos. Desta forma existe um interesse crescente pelo uso de antioxidantes de origem natural. Neste trabalho foi estudado o efeito da adição de antioxidantes naturais (extrato de casca de noz-pecã e extrato de alecrim) e antioxidantes sintéticos (BHT) sobre a estabilidade oxidativa de margarinas. Nas margarinas com teor de gordura de 60% foram adicionados 1000 ppm e 1500 ppm de extrato de casca de noz-pecã; 1000 ppm de extrato comercial de alecrim, e 100 ppm de BHT. As margarinas foram armazenadas a 4 °C por 8 meses e caracterizadas de acordo com o índice de peróxido, índice de *p*-anisidina, extinção específica (dienos e trienos conjugados), umidade, índice de acidez, ponto de fusão e perfil de ácidos graxos. No extrato de casca de noz-pecã e de alecrim foram determinados os teores de compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante (métodos ABTS e DPPH). Nas margarinas estudadas, análises de índice de peróxido, índice de *p*-anisidina, valor Totox, extinção específica e cor foram realizadas mensalmente. O perfil de ácidos graxos foi determinado no início e no fim do experimento. De acordo com os resultados obtidos para todas as amostras estudadas, ocorreu aumento no índice de peróxido, valor Totox e trienos conjugados ao longo do tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ). A partir do quinto mês de armazenamento observou-se uma tendência para a redução no índice de *p*-anisidina. O parâmetro de cor  $a^*$  externa aumentou significativamente ao longo do tempo de armazenamento, enquanto a cor  $L^*$  externa e a cor  $a^*$  interna mostraram uma redução. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, indicando que os extratos de noz-pecã podem ser utilizados neste tipo de aplicação, como um antioxidante natural.

**Palavras-chave:** casca de noz-pecã, alecrim, BHT, atividade antioxidante, oxidação, margarina.

## 1 Introdução

Os consumidores estão cada vez mais exigentes em relação a qualidade dos alimentos, e tem expectativas de que tal qualidade seja mantida a um nível elevado durante o período entre a compra e o consumo (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000). A oxidação lipídica produz mudanças indesejáveis na cor, sabor, odor, aroma, valor nutricional e textura, tornando os alimentos impróprios para consumo (VALENZUELA; NIETO, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006). Esta oxidação pode ser influenciada por diversos fatores e seu desenvolvimento pode ser retardado pelo uso de antioxidantes de origem sintética ou natural (FRANKEL et al., 1994).

Muitas pesquisas têm sido realizadas a respeito do uso de antioxidantes e os de origem sintética têm sido um motivo de preocupação durante as duas últimas décadas devido ao relato de efeitos deletérios e potencialmente perigosos para a saúde. Sendo assim, os antioxidantes naturais podem representar uma alternativa ao uso dos antioxidantes sintéticos. Além disto, a substituição de antioxidantes sintéticos por naturais tem sido imposta pelos consumidores uma vez que os mesmos são considerados mais seguros (VALENZUELA; NIETO, 1996; KIOKIAS et al., 2009).

Entre os alimentos susceptíveis a oxidação estão as margarinas. Os antioxidantes mais utilizados em margarinas são o BHT e o BHA, ou uma mistura de ambos (CHRYSAN, 2005). A adição de antioxidantes naturais também tem sido estudada em margarinas e emulsões, entre eles tocoferóis (AZIZKHANI; ZANDI, 2009, 2010; FILIP, 2009; AZIZKHANI et al., 2011), lecitina (AZIZKHANI; ZANDI, 2009, 2010), ácido ascórbico (FILIP, 2009), casca de amêndoa (*Prunus amygdalus*) (MOURE et al., 2007), orégano, sálvia e tomilho (ABDALLA; ROOZEN, 1999) e extrato de alecrim (AZIZKHANI; ZANDI, 2009, 2010; FRANKEL et al., 1996; SAMOTYJA; MALECKA, 2007; GRAMZA-MICHALOWSKA et al., 2008).

Vários estudos têm mostrado que as matérias primas vegetais com atividade antioxidante são ricas em compostos fenólicos, como exemplo pode ser citada a noz-pecã (PRADO et al., 2009a, 2009b, 2009c). No sul do Brasil, o processamento da noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] resulta em um volume aproximado de 40 a 50% de casca residual (WORLEY, 1994). A casca, que é comercializada para o preparo de chá, pode constituir uma fonte alternativa de compostos capazes de agir como antioxidantes devido a



presença de compostos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido p-hidroxibenzoico, epigallocatequina e epicatequina galato (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007, Prado et al., 2014).

Prado e colaboradores (2009a, 2009b, 2009c) reportam que infusões e extratos de casca de noz-pecã apresentam alto teor de fenólicos totais e taninos condensados, assim como elevada atividade antioxidante. Em outro estudo, micropartículas obtidas por *spray dryer* e contendo extratos de casca de noz-pecã foram adicionadas em óleo de soja, e aumentaram a estabilidade oxidativa em relação ao índice de peróxidos (Prado et al., 2014). Estudos *in vivo* também demonstraram as propriedades do extrato aquoso da casca de noz-pecã prevenindo o dano oxidativo induzido pela exposição à fumaça de cigarro e os efeitos deletérios do etanol no fígado indicando propriedades antioxidantes e hepatoprotetora em ratos (RECKZIEGEL et al., 2011; MÜLLER et al., 2013).

Tendo em vista os estudos anteriores em relação ao potencial antioxidante apresentado pela infusão da casca de noz-pecã e a falta de estudos com a aplicação deste tipo de extrato em sistemas alimentares, o presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade antioxidante deste extrato, quando adicionado em margarinas armazenadas a 4 °C, durante o período de 8 meses e comparar com um extrato comercial de alecrim e com o antioxidante sintético BHT.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Margarinas**

Amostras de margarinas (teor de gordura 60%, base soja) foram produzidas em planta piloto na empresa Bunge (60 potes para cada antioxidante adicionado, contendo 250 gramas) e acondicionadas em embalagens plásticas. As amostras foram armazenadas em geladeira durante 8 meses, e monitoradas diariamente quanto a umidade e temperatura (Termo-Higrômetro J-Prolab). A média de temperatura observada foi de 4°C ( $\pm 1$ ), e a média de umidade relativa do ar foi de 38 % ( $\pm 2$ ).

#### **2.1.2 Extrato de casca de noz-pecã e antioxidantes comerciais**

Foi utilizado o extrato obtido da infusão a quente da casca de noz-pecã, variedade Barton, safra de 2010, de acordo com Prado et al (2009a), o extrato comercial de alecrim obtido da empresa CHR HANSEN e o antioxidante sintético BHT (butil hidroxi tolueno) da Fluka Chemie/Suíça.

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Determinação dos compostos fenólicos totais e taninos condensados no extrato de noz-pecã e extrato comercial de alecrim**

O conteúdo de fenólicos totais do extrato de casca de noz-pecã e no extrato comercial de alecrim foi estimado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (BUDINI; TONELLI; GIROTTI, 1980; BEAL, 2006; PRADO et al., 2009a). Alíquotas (100 µL) de diluições apropriadas (passíveis de leitura de absorbância) dos extratos foram oxidadas com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, a reação foi neutralizada com 1,5 mL de carbonato de sódio saturado (75g/L) e, os volumes completados até 10 mL através da adição de água deionizada. Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente, a absorbância da solução azul resultante foi medida a 764 nm. A quantificação foi feita com base em curva padrão de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE/g (equivalente de ácido gálico) em peso seco. Para a determinação do teor de taninos condensados do extrato de casca de noz-pecã procedeu-se de acordo com Price, Vanscoyoc e Butter (1978) adaptado por Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007). Foram coletadas alíquotas de 1 mL de diluições apropriadas (passíveis de leitura de absorbância) dos extratos e colocadas em 2 tubos de ensaio separados (1 para a amostra e outro para o branco). Após foram adicionados 5mL do reagente Vanilina (0,5g de reagente e 200 mL de HCl 4%/metanol) para as amostras, e HCl 4%/metanol para o branco. Os tubos de ensaio foram mantidos ao abrigo da luz por um período de 20 minutos e as medidas das absorbâncias realizadas em espectrofotômetro em 500 nm. Os resultados foram expressos em mg CE/g<sup>-1</sup> (mg equivalente de catequina.g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada).

## **2.2.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato de casca de noz-pecã e do extrato comercial de alecrim**

### **2.2.2.1 Método ABTS**

O método ABTS [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizado de acordo com Re et al. (1999) seguido de modificações de Prado et al., 2009a. Após o preparo do radical ABTS (7 mmol.L<sup>-1</sup> - 0,03836g do reativo ABTS dissolvido em 10 mL de água deionizada), foi preparada uma solução de persulfato potássico (2,45 mmol.L<sup>-1</sup> - 10 mL de ABTS e 10 mL de persulfato misturados, homogeneizados e mantidos em frasco ambar pelo mínimo de 16 horas e protegido da luz). Foi pipetada uma alíquota de 200 µL do radical formado e diluído em 10 mL de etanol 96° P.A. e as medidas de absorvância em cubetas de 10 mm a 734 nm foram realizadas para certificação da densidade óptica em torno de  $0,700 \pm 0,05$ . Uma alíquota de 980 µL do radical diluído foi pipetada e transferida para uma cubeta de 10 mm (1 mL) procedendo a medida da absorvância ( $A_{754}=A_0$ ) adicionando imediatamente 20 µL da amostra (em diluições apropriadas inferiores a 0,7 de absorvância) e homogeneizando e agitando por alguns segundos. Trolox foi utilizado como padrão (15 µM = 0,13209g/500 mL). O cálculo da percentagem de inibição do radical foi realizado pela seguinte fórmula: % de inibição do radical =  $(1 - A_f/A_0) \times 100$ , onde, “ $A_0$ ” é a absorvância inicial e “ $A_f$ ” é a absorvância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostra analisada (de 2 a 400 µM de Trolox) de forma que ao obter os resultados se pode realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em µmol TEAC/g (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

### **2.2.2.2 Método DPPH**

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foi realizado de acordo com Brand-William, Cuvelier e Berset (1995) seguido de modificações conforme Kim et al. (2002), Villarreal-Lozoya, Lombardini e Cisneros-Zevallos (2007) e Prado et al. (2009a). Após o preparo do radical (0,1 mmol.L<sup>-1</sup> - 0,03943 g do reativo DPPH dissolvido em 10 mL de metanol a 80%), foi pipetada uma alíquota de 2,9 mL e colocada para reagir em tubos de ensaio, aos quais foi adicionado 0,1 mL do extrato da casca de noz-pecã, assim como para o extrato de alecrim (em diluições apropriadas com absorvância inferior a

0,7). As amostras foram mantidas ao abrigo da luz e, as medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 515 nm após 30 min. Trolox foi utilizado como padrão (150 mg.L<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em mg TEAC/g (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).

### **2.2.3 Procedimento experimental para adição dos antioxidantes nas margarinas e preparação das mesmas antes das análises**

A adição dos antioxidantes nas margarinas foi realizada como segue:

- Tratamento 1: Margarina com adição de 1000 ppm de extrato de casca de noz-pecã;
- Tratamento 2: Margarina com adição de 1500 ppm de extrato de casca de noz-pecã;
- Tratamento 3: Margarina com adição de 1000 ppm de extrato comercial de alecrim;
- Tratamento 4: Margarina controle com adição de 100 ppm de BHT.

As concentrações de antioxidantes escolhidas se baseam no fato de que o extrato de alecrim, segundo Chu e Hsu, 1999, tem limite máximo de 1000 ppm devido a questões sensoriais, sendo assim, foi utilizado o extrato de casca de noz-pecã na mesma concentração e na concentração de 1500 ppm para analisar um possível efeito pró-oxidante, para o BHT, 100 ppm, é o limite máximo permitido na legislação (Brasil, 1997). Não foi utilizado um branco, sem antioxidante, pois atualmente nenhuma margarina produzida comercialmente está ausente de antioxidantes. As margarinas foram fundidas em estufa a 60°C (devido ao ponto de fusão do ácido palmítico = 62,9°C) e filtradas em sulfato de sódio anidro antes das análises, de caracterização e avaliação da oxidação ao longo do tempo.

### **2.2.4 Caracterização físico-química das margarinas**

A caracterização das margarinas foi realizada de acordo com a metodologia oficial da AOCS (2004) através das seguintes análises: índice de peróxidos (Cd 8-53); extinção específica (Ch 5-91); umidade (Ca 2c-25); índice de *p*-anisidina (Cd 18-90); índice de acidez (Cd 3d-63); ponto de fusão (Cc 1-25); composição em ácidos graxos (Ce 1-62):

ésteres metílicos obtidos de acordo com Hartman e Lago (1973); condições de análise: Cromatógrafo Gasoso Capilar – GC 2010 - Shimadzu. Coluna capilar: HP 88, dimensões 100 m, Ø int: 0.25 mm, 0.20 µm filme; condições de operação do cromatógrafo: split = 1:150; fluxo da coluna = 0,92 mL/min.; temperatura do detector: 260°C; temperatura do injetor: 150°C; temperatura do forno: 140°C – 6 min, 140°C – 240°C (4°C/min), 240°C – 6 min; gás auxiliar (make up gas): nitrogênio; gás de arraste: hélio; volume injetado: 1.0 µL e; OSI (Oil Stability Index Cd 12b-92; Equipamento Rancimat®; Temperatura: 110°C, Delta T: 1,5 °C; fluxo do gás: 9 L/h, peso da amostra: 3g.

### **2.2.5 Avaliação da qualidade das margarinas durante estocagem**

As margarinas foram avaliadas mensalmente durante 8 meses através das seguintes análises: índice de peróxidos (AOCS Cd 8-53); extinção específica (AOCS Ch 5-91), índice de *p*-anisidina (AOCS Cd 18-90) e cor utilizando colorímetro Minolta Chromo Meter CR 400 (Konica Minolta, Osaka, Japao), acoplado a um processador DP-100, com iluminante D65 e ângulo de 10 graus. Foi utilizado o sistema de avaliação CIELab (*Comission Internationale de Eclairage*), escala de cor L\*, a\*, b\*, onde L\* corresponde a luminosidade (0 = preto e 100 = branco); a\* corresponde a variação de cor de verde a vermelho (-a = verde e +a = vermelho); b\* corresponde a variação de cor de azul a amarelo (-b = azul e +b= amarelo). Para a cor, foram avaliadas as variações de parâmetros tanto da parte externa (parte superior e visível no pote), como da parte interna (após retirada da película superior) das margarinas, sendo que este parâmetro foi analisado quanto a tendência em aumentar ou diminuir o índice. No tempo final de armazenamento, foi realizada uma nova análise do perfil de ácidos graxos para verificar se ocorreu diferença significativa entre o tempo inicial e o tempo final.

### **2.2.6 Análise microbiológica**

Foram realizados testes de Coliformes a 45°C, nas amostras de margarina, mensalmente, durante o período de 8 meses.

### **2.2.7 Análise estatística**

Para cada dia de análise foram realizados sorteios aleatórios sem reposição das unidades amostrais para cada tipo de margarina (ou seja, os 4 diferentes tratamentos com os antioxidantes) com o propósito de diminuir a influência dos erros sistemáticos e aleatórios nos resultados. Foi realizada a triplicata da análise e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP), neste caso existe a ausência do branco, pois nenhuma margarina é produzida sem adição de antioxidante. Nos parâmetros de identidade, análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey foram determinadas através do software *SAS® 9.1.3 Portable*, considerando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para verificar diferenças significativas. Foram realizadas análises de regressão para avaliação do comportamento das margarinas ao longo do tempo e análise de variância ANOVA para comparação entre os tratamentos, através do Software R 2.15.2 Rcmdr Package ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais, taninos condensados e atividade antioxidante *in vitro* do extrato da casca de noz-pecã e do extrato comercial de alecrim

Na Tabela 1 podem ser observados os resultados obtidos para o extrato seco, teores de compostos fenólicos totais, taninos condensados e capacidade antioxidante *in vitro* da infusão da casca de noz-pecã e do extrato comercial de alecrim.

Tabela 1 Extrato seco (ES), compostos fenólicos totais (FT), taninos condensados (TC) e capacidade antioxidante (CA) *in vitro* do extrato obtido por infusão da casca de noz-pecã e extrato comercial de alecrim.

	ES	FT	TC	CA <sub>ABTS</sub>	CA <sub>DPPH</sub>
	(g/100g)*	(mg GAE/g)*	(mg CE/g)*	( $\mu$ mol TEAC/g)*	(mg TEAC/g)*
<b>Noz-pecã</b>	31 $\pm$ 0,9	93 $\pm$ 2	46 $\pm$ 1	1257 $\pm$ 6,5	293 $\pm$ 1
<b>Alecrim</b>	4,15 $\pm$ 0,5	102,9 $\pm$ 5	38,9 $\pm$ 5	2306 $\pm$ 9	856 $\pm$ 16

\*ES = Extrato seco (método gravimétrico - AOAC), FT = Fenólicos totais – mg GAE/g (equivalente em ácido gálico) de peso seco (método de Folin-Ciocalteu), TC = Taninos condensados – mg CE/g (mg equivalente catequina/g) de peso seco (método da vanilina), CA<sub>ABTS</sub> = Capacidade antioxidante -  $\mu$ mol TEAC/g

(Trolox equivalente atividade antioxidante) de peso seco (ABTS),  $CA_{DPPH}$  = Capacidade antioxidante - mg TEAC/g (Trolox equivalente atividade antioxidante) de peso seco (DPPH).

De acordo com os resultados obtidos o valor determinado para o extrato seco foi de  $31 \pm 0,9$  g/100g e de  $4,15 \pm 0,5$  g/100g, para os extratos de noz-pecã e de alecrim respectivamente. Prado et al. (2013, 2009b) reportaram o valor de  $32,12 \pm 0,43$  g/100g para a variedade Barton da noz-pecã e o valor de  $23 \pm 0,5$  g/100g para uma mistura de variedades.

Para o teor de fenólicos totais, o valor determinado para o extrato de noz-pecã foi de  $93 \pm 2$  mg GAE/g. Este valor foi inferior ao encontrado por Prado et al. (2009b; 2013) que reportaram o valor de  $138 \pm 26$  mg GAE/g e  $181,49 \pm 6,97$  mg GAE/g, para infusão de um mistura de variedades da safra de 2006 e para infusão da variedade Barton safra 2010, respectivamente. Villarreal-Lozoya et al. (2007), observaram valores inferiores de 80 mg GAE/g em extratos de casca de noz-pecã de diferentes cultivares extraídas com uma mistura de acetona:água (70:30 v/v). La Rosa et al. (2011), que analisaram cascas de nozes-pecãs mexicanas compostas das variedades Wichita e Western provenientes de 3 regiões de cultivo, observaram valores para compostos fenólicos entre 65,3 e 92,5 mg GAE/g.

Para o extrato de alecrim, o valor de fenólicos totais encontrado foi de  $102,9 \pm 5$  mg GAE/g. Na Tabela 2 podem ser observados resultados para o teor de fenólicos totais em diferentes extratos de alecrim. Para extratos etanólicos, similar ao comercial adquirido, os valores variam de 10 a 73,5 mg GAE/g (Asolini et al., 2006; Mata et al., 2007; Gibis; Weiss, 2012), para extratos aquosos, metanólicos e supercríticos, os valores podem chegar a 450 mg GAE/g (Bubonja-Songe et al., 2011), sendo que as diferenças encontradas relativas aos teores de fenólicos estão diretamente ligadas ao método de extração (JUSTO et al., 2008).

Tabela 2 Valores de fenólicos totais em diferentes extratos de alecrim

Valor de fenólicos totais (mg GAE/g)	Tipo de extrato	Referência
10	Etanólico	Gibis e Weiss (2012)
47	Etanólico	Asolini et al. (2006)
54,6	Supercrítico	Justo et al. (2008)
58,4	Aquoso	Mata et al. (2007)
73,5	Etanólico	Mata et al. (2007)
162	Metanólico	Erkan et al. (2008)
185	Aquoso	Chen et al. (2007)
450	Metanólico	Bubonja-Songe et al. (2011)

Em relação ao teor de taninos condensados o valor determinado no presente trabalho ( $46 \pm 1$  mg CE/g) está de acordo com o reportado por Prado et al. (2009b) e Villarreal-Lozoya et al. (2007) que reportaram em extratos aquosos valores de  $43 \pm 7$  mg CE/g e  $42 \pm 1,5$  mg CE/g, respectivamente. Prado et al. (2013) reportaram um valor de  $36,94 \pm 3,20$  mg CE/g e, Villarreal-Lozoya et al. (2007) reportaram um valor superior ( $634 \pm 67$  mg CE/g) para extratos obtidos da mistura acetona e água. Para o extrato de alecrim o valor encontrado foi de  $38,9 \pm 5$  mg CE/g, resultado superior ao reportado por Yosr et al. (2013), que analisaram o teor em diferentes fases de crescimento da planta e encontraram valores médios para folhas de 2,4 mg CE/g e para caules de 0,8 mg CE/g, sendo as fases vegetativa e de frutificação de maiores teores, isso ocorre devido a alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares.

A capacidade antioxidante determinada através do método ABTS para o extrato de noz-pecã foi de  $1257 \pm 6,5$   $\mu$ mol TEAC/g, valor inferior ao reportado por Prado et al. (2009b, 2013), de  $1404 \pm 330$   $\mu$ mol TEAC/g e  $1809,01 \pm 27,18$   $\mu$ mol TEAC/g, respectivamente. La Rosa et al. (2011) reportaram valores entre 518,4 e 644,2  $\mu$ mol TEAC/g. Para o extrato de alecrim, o valor encontrado de  $2306 \pm 9$   $\mu$ mol TEAC/g ( $2,31 \pm 0,12$  mmol TEAC/g), foi inferior a valores reportados por Mariutti et al. (2008) e Justo et al. (2008) de  $89 \pm 5$  mmol TEAC/g e  $190 \pm 13$  mmol TEAC/g, respectivamente, que utilizaram a tecnologia de extração supercrítica para a obtenção do extrato.

A capacidade antioxidante determinada através do método DPPH para o extrato de noz-pecã ( $293 \pm 1$  mg TEAC/g), foi menor do que a observada por Prado et al. (2009b, 2013) e Villarreal-Lozoya et al.



(2007) de  $385 \pm 94$ ,  $612,24 \pm 26,73$  e,  $487 \pm 42$  mg TEAC/g, respectivamente. La Rosa et al. (2011), reportaram valores entre 537,8 e 720,3  $\mu\text{mol TEAC/g}$ . Para o extrato de alecrim, o valor determinado para a capacidade antioxidante de  $856 \pm 16$  mg TEAC/g ( $3,42 \pm 0,16$  mmol TEAC/g), foi inferior ao reportado por Mariutti et al. (2008) que reportaram um valor de  $89 \pm 5$  mmol TEAC/g e por Justo et al. (2008), que reportaram valores de  $78 \pm 2$  e  $86 \pm 1$  mmol TEAC/g, utilizando a tecnologia de extração supercrítica.

Diferentes métodos e diferentes solventes, utilizados na extração, afetam significativamente a capacidade antioxidante tanto para o método ABTS quanto para o método DPPH (Pérez-Jiménes; Saura-Calixto, 2006). Villareal-Lozoya et al. (2007), reportaram alta atividade antioxidante das cascas de noz-pecã e conteúdo de fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH) e taninos condensados aproximadamente 6, 4,5 e 18 vezes maiores quando comparado com a noz-pecã. La Rosa et al. (2011) também reportaram concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante maior na casca que na amêndoa.

### 3.2 Caracterização inicial da margarina

Os valores obtidos para os parâmetros de identidade e qualidade das margarinas adicionadas dos diferentes antioxidantes são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros de identidade e qualidade das margarinas estudadas.

Análise*	Margarina
Peróxido (mEq/kg)	$0,24 \pm 0,01$
p-anisidina	$1,38 \pm 0,37$
Dienos conjugados %	$3,54 \pm 1,28$
Trienos conjugados %	$0,20 \pm 0,01$
Acidez mg KOH/g	$0,57 \pm 0,04$
Umidade %	$36,2 \pm 0,11$
Ponto de fusão °C	$36 \pm 0,57$

<b>Perfil de Ácidos Graxos (%)</b>	<b>Margarina</b>
C 16:0 – Ácido palmítico	15,1 ± 0,9
C 18:0 – Ácido esteárico	10,1 ± 0,09
C 18:1 9t – Ácido elaídico	9,7 ± 0,65
C 18:1 – Ácido oléico	26,1 ± 0,25
C 18:2 6t – Ácido linolelaídico	3,2 ± 0,06
C 18:2 6c – Ácido linoleico	32,7 ± 0,52
C 18:3 3 – Ácido linolênico	3,0 ± 0
Total AG saturados	25,2
Total AG monoinsaturados	35,8
Total AG poli-insaturados	38,9

\*Valores referentes a média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata

A legislação brasileira não determina os limites máximos para os índices de qualidade estudados, mas a margarina produzida apresentou índice de qualidade adequado, considerando o índice de peróxido menor que 2,5 mEq/kg adotado para óleos vegetais (Brasil, 2006), sendo possível a sua utilização nos estudos de oxidação. Em relação ao perfil de ácidos graxos, foi determinado o conteúdo de ácidos graxos trans (12,8% de ácido elaídico). Os teores obtidos para ácido palmítico e ácido linolênico indicam a presença de óleo de soja e palma na composição da margarina (Basiron, 2005; Brasil, 2006).

Os períodos de indução determinados através do OSI foram de 16, 15, 19 e 15,4 horas para os extratos de noz pecã com 1000 e 1500ppm, extrato de alecrim e BHT respectivamente. De acordo com a análise estatística o alecrim apresentou um período de indução significativamente mais elevado. A diferença entre os extratos de noz pecã com 1000 e 1500 ppm foram significativas entre si mas não apresentaram diferença significativa quando comparados com o BHT. Isbell et al., 1999, reportaram valores de OSI para óleo de soja de 19,9 horas a 110 °C e Jebe et al., 1993, reportaram tempos entre 20 e 30 horas para a palma, sendo que a hidrogenação e a presença de antioxidantes levam a diminuição desses tempos.

Azizkhani et al. (2011) reportaram para margarinas formuladas com óleo de girassol e estearina de palma (80:20) e, adicionadas de 100, 250 e 500 ppm de  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol, períodos de indução determinados

por Rancimat entre 1.15 e 5.6 horas. A composição de ácidos graxos e o tipo de antioxidante utilizado afetam diretamente o tempo de indução (Jebe et al., 1993).

### **3.3 Avaliação da qualidade das margarinas durante a estocagem**

Na tabela 4 podem ser observados os resultados relativos a avaliação da qualidade (índice de peróxido, índice de *p*-anisidina, dienos conjugados, trienos conjugados, cor e valor Totox) das margarinas estudadas durante a estocagem.

Tabela 4 Avaliação da qualidade das margarinas adicionadas dos extratos durante o período de armazenamento.

		Tempo (dias) *							
		30	60	90	120	150	180	210	240
Noz-Peca 1000 ppm	Peróxido	0,24±0,002c	0,47±0,004c	2,19±0,16b	1,98±0,44b	3,33±0,33a	3,5±0,61a	3,63±0,15a	3,75±0,37a
	Anisidina	1,50±0,97b	2,07±0,35ab	3,09±0,06a	2,81±0,90ab	2,83±0,39ab	2,23±0,26ab	1,78±0,4ab	2,73±0,27ab
	Totox	1,98f	3,01e	7,47c	6,77d	9,49b	9,23b	9,04b	10,23a
	Dienos	4,47±0,13a	5,05±0,35a	4,43±0,28a	4,97±0,36a	4,36±0,11a	5,06±0,44a	4,29±0,10a	4,38±0,21a
	Trienos	0,21±0,01c	0,92±0,01ab	0,95±0,002a	0,94±0,02ab	0,94±0,01ab	0,91±0,01ab	0,90±0,01b	0,92±0,004ab
	L* (ext.)	87,18ab	84,49c	82,43c	87,60a	84,66bc	84,41c	84,30c	83,27c
	a* (ext.)	-1,02d	-0,54bc	-0,41b	-0,87cd	-0,25ab	-0,47bc	0,03a	-0,54bc
	b* (ext.)	44,30d	50,03c	48,42cd	52,66abc	51,47bc	48,66cd	55,65ab	56,85a
	L* (int.)	85,21b	86,03ab	87,83ab	88,81a	87,00ab	85,20b	85,01b	85,03b
	a* (int.)	-1,15ab	-0,87a	-0,85a	-0,86a	-0,94a	-0,83a	-0,85a	-1,56b
Noz-Peca 1500 ppm	b* (int.)	32,19c	33,56abc	35,39ab	35,77a	34,50abc	33,35bc	32,67c	32,59c
	Peróxido	0,48±0,008f	0,82±0,14ef	1,13±0,20ed	1,84±0,20c	1,50±0,36cd	4,25±0,09a	3,28±0,26b	4,05±0,18a
	Anisidina	1,46±0,60b	3,04±0,005a	2,75±0,45ab	3,05±0,47a	2,56±0,59ab	2,24±0,47ab	2,53±0,85ab	1,78±0,24ab
	Totox	2,42h	4,68g	5,01f	6,73d	5,56c	10,74a	9,09c	9,88b
	Dienos	4,55±0,39ab	4,92±0,13a	4,37±0,31ab	5,00±0,19a	4,53±0,16ab	4,90±0,34a	4,03±0,29b	4,44±0,25ab
	Trienos	0,22±0,009b	0,93±0,02a	0,94±0,03a	0,95±0,01a	0,95±0,01a	0,96±0,03a	0,92±0,01a	0,94±0,006a
	L* (ext.)	86,80a	85,23ab	81c	82,92bc	83,20bc	83,63bc	83,25bc	84,51ab
	a* (ext.)	-0,4bc	-0,90cd	-1,29d	0,25ab	-0,26bc	0,45a	0,20ab	-0,59c
	b* (ext.)	49,32bc	46,65cd	44,62d	55,07a	46,83cd	48,7bc	47,81cd	52,05ab
	L* (int.)	89,77a	87,24abc	87,46abc	88,50ab	84,82cd	83,72d	88,14abc	85,03bcd
Aleurim 1000 ppm	a* (int.)	-0,82a	-0,87a	-0,73a	-1,04abc	-0,96ab	-1,30bc	-0,89a	-1,38c
	b* (int.)	32,44ab	33,44a	34,69a	33,56a	33,64a	29,41b	32,98a	32,72a
	Peróxido	0,47±0,005d	0,95±0,007d	2,25±0,30bc	1,85±0,17c	1,70±0,34c	4,29±0,12a	2,82±0,19b	4,43±0,41a
	Anisidina	2,13±0,90bc	3,33±0,20ab	3,42±0,25ab	3,67±0,74a	3,09±0,51ab	2,36±0,77abc	1,51±0,38c	1,22±0,17c
Aleurim 1000 ppm	Totox	3,07h	5,23g	7,92c	7,37d	6,49f	10,94a	7,15e	10,08b
	Dienos	4,53±0,04ab	4,54±0,16ab	4,26±0,28ab	4,90±0,19a	4,47±0,27ab	4,70±0,26ab	3,97±0,36b	4,59±0,39ab

BHT 100 ppm	Trienos	0,21±0,008b	0,93±0,02a	0,91±0,01a	0,92±0,01a	0,93±0,01a	0,94±0,01a	0,91±0,03a	0,94±0,01a
	L* (ext.)	85,83a	85,23a	86,63a	85,24a	82,38ab	79,63b	83,47ab	83,01ab
	a* (ext.)	-0,68bcd	-0,77cd	-0,95d	-0,29abcd	0,06ab	0,46a	0,24a	-0,12abc
	b* (ext.)	50,94ab	48,58ab	48,35ab	53,06a	50,88ab	45,96b	47,93ab	51,19a
	L* (int.)	87,53ab	84,7bcd	87,17abc	84,36cd	86,85abc	85,88abcd	88,34a	83,39d
	a* (int.)	-1,06a	-1,03a	-0,95a	-0,85a	-0,94a	-1,17a	-0,86a	-1,97b
	b* (int.)	32,40ab	32,74ab	35,21a	32,46ab	34,11ab	33,79ab	33,32ab	31,16b
	Peróxido	0,47±0,001d	0,90±0,02d	1,28±0,15d	2,47±0,32c	2,59±0,19c	3,53±0,48b	2,39±0,20c	4,43±0,60a
	Anisidina	1,86±0,39cd	2,43±0,08bcd	3,05±0,52abc	3,88±0,1a8	3,17±0,00ab	2,15±0,80bcd	2,26±0,43bcd	1,59±0,53d
	Totox	2,8h	4,23g	5,61f	8,82c	8,35d	9,21b	7,04e	10,45a
	Dienos	4,52±0,17ab	4,98±0,16a	4,30±0,40ab	4,83±0,23ab	4,70±0,30ab	4,64±0,27ab	4,13±0,15b	4,47±0,22ab
	Trienos	0,21±0,02b	0,90±0,01a	0,90±0,02a	0,93±0,01a	0,93±0,01a	0,93±0,01a	0,90±0,02a	0,93±0,006a
	L* (ext.)	86,04a	84,14ab	83,72ab	84,42ab	82,91ab	83,34ab	81,99b	83,35ab
	a* (ext.)	-1,14b	-0,58ab	-0,30ab	-0,30ab	-0,15ab	-0,70ab	0,11a	-0,28ab
	b* (ext.)	44,90d	52,75ab	56,26a	52,19ab	49,61bc	47,63cd	49,42bc	53,35ab
	L* (int.)	86,80abc	86,81abc	88,20ab	84,93c	88,84a	85,37c	88,19ab	86,49bc
	a* (int.)	-1,20a	-0,86a	-1,08a	-1,07a	-1,07a	-1,29ab	-1,23a	-1,79b
	b* (int.)	31,53c	32,98ab	33,32a	31,81bc	33,05a	31,56c	32,53abc	32,17abc

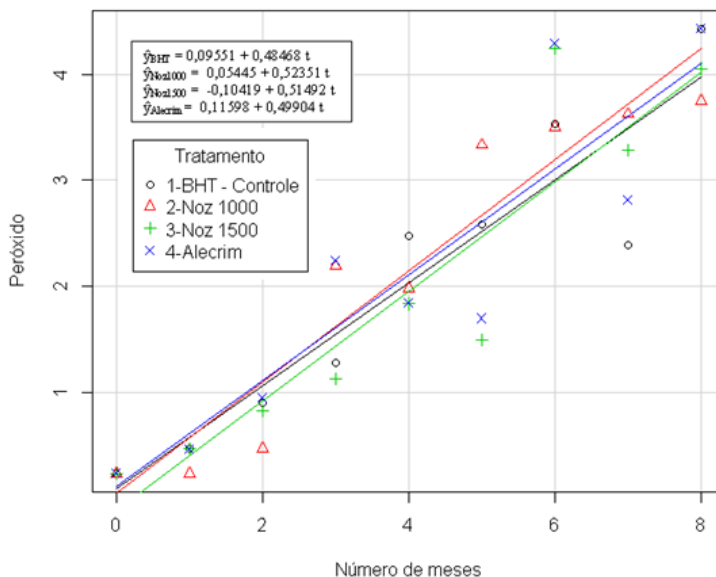
\*Média ± desvio padrão. Valor de peróxido: mEq/Kg. Dienos e trienos %, parâmetro de cor externa (ext.) e interna (int.). L\*: Luminosidade (0 = preto e 100 = branco); a\*: variação de cor de verde a vermelho (-a = verde e +a = vermelho); b\*: variação de cor de azul a amarelo (-b = azul e +b = amarelo). \*\*Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística significativa, Tukey Test, (p<0,05).

A análise de caracterização inicial das margarinas determinou um índice de peróxido de 0,24 mEq/kg. No primeiro mês a margarina adicionada de 1000 ppm de extrato de noz-pecã manteve o índice, sendo que os outros 3 tratamentos o aumentaram para cerca de 0,47 mEq/kg, neste mesmo período. Do terceiro para o quarto mês de armazenamento, a margarina adicionada de 100 ppm de BHT apresentou um aumento significativo no índice, de 1,28 para 2,47 mEq/kg, sendo que para a margarina adicionada de 1000 ppm de noz-pecã esse aumento ocorreu do quarto para o quinto mês (de 1,98 para 3,33 mEq/kg), e para a noz-pecã 1500 ppm e alecrim 1000 ppm ocorreram do quinto para o sexto mês (de 1,50 para 4,25 mEq/kg, e de 1,70 para 4,29 mEq/kg, respectivamente).

De acordo com os resultados obtidos no tempo final do período de armazenamento as margarinas adicionadas de 1000 ppm de extrato de noz-pecã apresentaram menor índice de peróxido (3,75 mEq/kg), seguidas pelas margarinas adicionadas de 1500 ppm de extrato de noz pecã (4,05 mEq/kg) e, extrato 1000 ppm de extrato de alecrim e BHT (ambos 4,43 mEq/kg). Atualmente a legislação brasileira de margarinas, não determina os valores máximos para este índice.

A evolução do índice de peróxido ao longo do tempo pode ser explicada pelo modelo de regressão linear ( $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1.t_i + \epsilon_i$ ). Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 1. A equação estimada geral para todos os tratamentos é  $\hat{y}_i = 0,040 + 0,505 t.$ , isto indica que a cada mês existe um acréscimo médio de 0,5 no índice de peróxido em todos os tratamentos, devido ao avanço da oxidação, que levam a formação dos produtos secundários mais estáveis (ARAGÃO et al., 2008). A formação e decomposição dos hidroperóxidos em sistemas emulsionados são dependentes da efetiva concentração do antioxidante na fase de óleo, de água e na interface, devido ao complexo fenômeno interfacial (FRANKEL et al., 1996).

Figura 1 Evolução do índice de peróxido, mEq/kg, nas margarinas estudadas, em função do tempo e do antioxidante adicionado.



Para todas as margarinas estudadas, foi observado um aumento significativo no índice de peróxido ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da equação foi de 0,8565, o que indica que o modelo é adequado para explicar a relação da variação do índice de peróxido em relação ao tempo. Entre os tratamentos não foram encontradas diferenças estatísticas significativas, o que indica que todos os tratamentos apresentaram evolução similar quanto ao índice de peróxido.

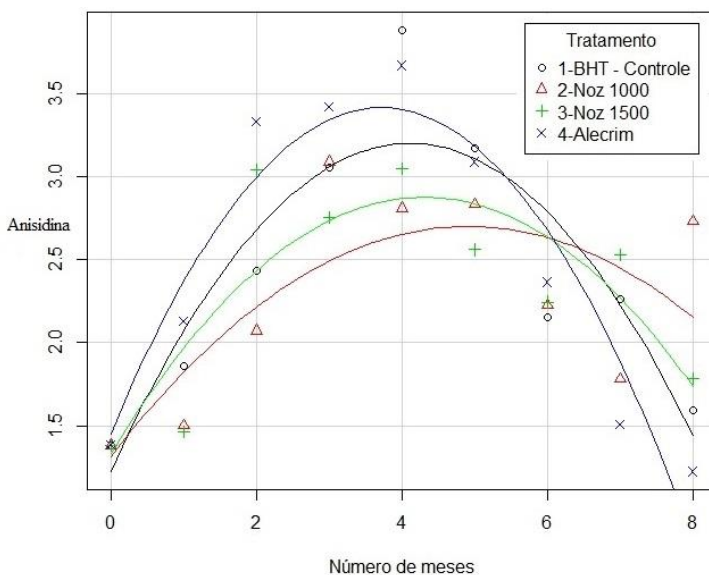
Nogala-Kalucka e Gogolewski (1999), reportaram para margarinas, com 80% de lipídios e armazenadas a 4°C durante um período de 158 dias, índice de peróxido de até 5 mEq/kg. Nogala-Kalucka e Gogolewski (2000), observaram um índice de peróxido de 0,14 mmol O<sub>2</sub>/kg ou 0,28 mEq/kg (segundo fator de conversão de Pomeranz e Meloan, 1994) após 136 dias de armazenamento a 4°C, valor inferior aos obtidos para os quatro tratamentos do presente estudo, considerando o mesmo período. Silva (2009), observou que margarinas com teor de gordura de 40%, armazenadas a 5°C e produzidas com

diferentes teores de óleo de soja e palma, apresentaram após 75 dias índice de peróxido entre 1,7 mEq/kg e 2,1 mEq/kg.

Inicialmente o índice de *p*-anisidina foi de 1,38, sendo que com o armazenamento apresentou tendência ao aumento, mas a partir do 5º mês todos os tratamentos apresentaram uma tendência para a redução. No tempo final de armazenamento, o maior índice de *p*-anisidina foi observado para o tratamento com 1000 ppm de noz-pecã ( $2,73 \pm 0,27$ ). Óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como o óleo de soja, devem apresentar índice de *p*-anisidina entre 1 e 10 (SILVA et al., 1999; LOPEZ-AGUILAR et al., 2006). Em todos os tratamentos, o valor recomendado de 10 não foi alcançado.

A evolução do índice de *p*-anisidina ao longo do tempo pode ser explicada pelo modelo de regressão quadrático ( $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1.t_i + \beta_2.t_i^2 + \epsilon_i$ ). Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 Evolução do índice de *p*-anisidina das margarinas estudadas em função do tempo e do antioxidante utilizado.



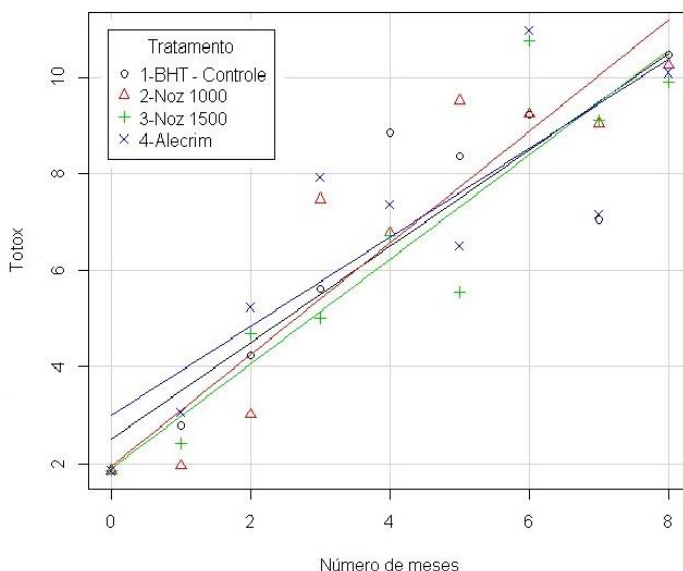


Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, todos os tratamentos apresentaram a mesma evolução do índice de *p*-anisidina, sendo a equação estimada a partir dos resultados obtidos para todos os tratamentos:  $\hat{y}_i = 1,330 + 0,825t_i - 0,100t_i^2$ . Para todas as margarinas estudadas, foi observado que o modelo quadrático é significativo ( $p < 0,05$ ), representando o comportamento ocorrido. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da equação foi de 0,65, o que indica que a variação observada de 65% no índice de *p*-anisidina ocorreu em função de uma relação quadrática com o tempo. O  $R^2$  baixo indica que a variação ocorreu por outros motivos além do tempo, como por exemplo, é dependente da taxa de formação dos hidroperóxidos (ARAGÃO et al., 2008).

Ramful et al. (2011) reportaram para uma emulsão preparada com óleo de soja e BHT, índice de *p*-anisidina de  $3,8 \pm 0,2$  após 18 dias de armazenamento a 40 °C. Gokoglu et al. (2012) reportaram que emulsões preparadas com óleo de girassol ou óleo de girassol e óleo de peixe, adicionadas de extratos de tomate e alho e armazenadas a 4 °C durante 24 dias, apresentaram uma tendência para o aumento do índice de *p*-anisidina durante o armazenamento, mas apresentaram redução dos valores após 12 dias.

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que todos os tratamentos apresentaram tendência no aumento do valor Totox. Óleos e gorduras bem conservados devem apresentar um valor Totox inferior a 10 (SILVA et al., 1999; OETTERER, 2006). No 6º mês as amostras adicionadas de 1500 ppm de extrato de noz-pecã e 1000 ppm de extrato de alecrim, apresentaram um valor Totox superior a 10. No final do período de armazenamento todas as amostras apresentaram valor Totox ligeiramente superiores a 10 como pode ser observado na Figura 3, indicando o grau de rancidez ligeiramente superior ao recomendado após todo o período de armazenamento.

Figura 3 Evolução do valor Totox, em função do tempo e do antioxidante utilizado.



A equação estimada a partir dos resultados obtidos ( $\hat{y}_i = 2,344 + 1,037 t_i$ ) indicou que a variação do valor Totox é significativa ao longo do tempo e que não existe diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, todos os tratamentos apresentaram evolução similar do valor Totox.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que as margarinas estudadas apresentaram um aumento no índice de dienos conjugados (de 3,54 para valores entre 4,47 a 4,55) após o primeiro mês de armazenamento. A partir do segundo mês os valores de dienos mantiveram-se estáveis e os valores finais determinados (entre 4,44 e 4,59). Em relação aos resultados obtidos para os trienos conjugados, é possível observar que a partir do segundo mês houve aumento nos trienos conjugados (em torno de 0,2 para 0,9), mantendo-se estável até o final do experimento. Os resultados para dienos e trienos conjugados ao longo do tempo podem ser observados nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 Evolução do índice de dienos, em função do tempo e do antioxidante utilizado.

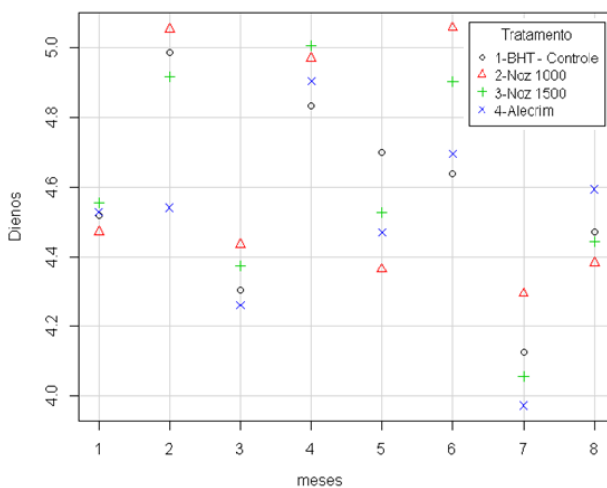
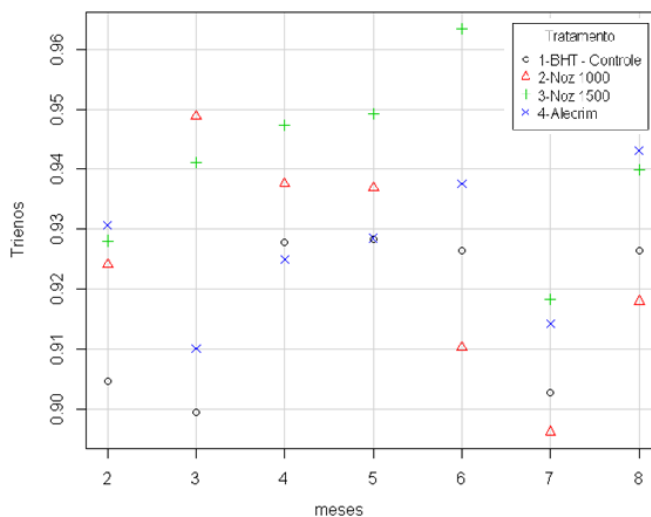


Figura 5 Evolução do índice de trienos, em função do tempo e do antioxidante utilizado.



Para os trienos conjugados houve uma variação significativa entre o tempo 0 (em torno de 0,2) e após 60 dias de armazenamento (cerca de 0,9). A partir do segundo mês não foram observadas variações ao longo do tempo e por este motivo o tempo zero e o mês 1 foram excluídos para a análise estatística, devido a diferença de comportamento neste período. Em relação a ambos os índices, não foram encontradas diferenças significativas considerando os diferentes tratamentos, ou seja, todos os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento em relação a dienos e trienos.

Gokoglu et al. (2012), reportaram para emulsões preparadas com óleo de peixe e óleo de girassol adicionadas de extrato de tomate e alho, índice de dienos conjugados variando entre 2,5 e 4,5 após 24 dias de armazenamento a 4°C. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente trabalho após 30 dias de armazenamento. Para os trienos conjugados os mesmos autores reportam que não observaram alterações do primeiro dia até o vigésimo quarto dia de armazenamento a 4°C. Extratos de chá verde na concentração de 0,03%, adicionados em emulsões de óleo de girassol (30%) armazenados a 30°C por 40 dias, foram efetivos no controle de dienos conjugados e apresentaram atividade similar ao BHT na concentração de 0,02% (ROEDIG-PENMAN; GORDON, 1997).

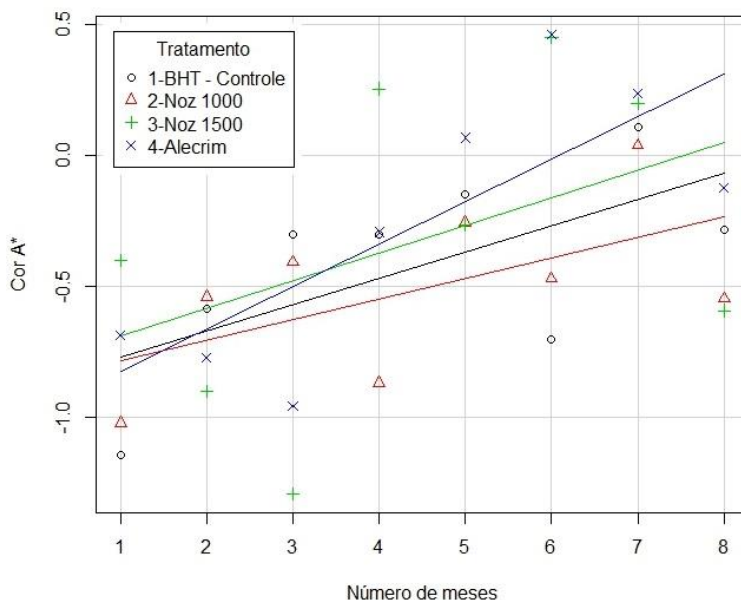
Dienos conjugados são frequentemente medidos como indicadores da produção de radicais livres, no entanto, radicais livres são muito instáveis e reagem rapidamente com outros componentes assim que são produzidos, um possível fator de interferência é a quebra da emulsão. Os dienos conjugados refletem apenas a extensão da autooxidação lipídica nos estágios iniciais sendo a mudança no valor de absorção relacionada com a autooxidação lipídica nestes estágios (SUN et al., 2011).

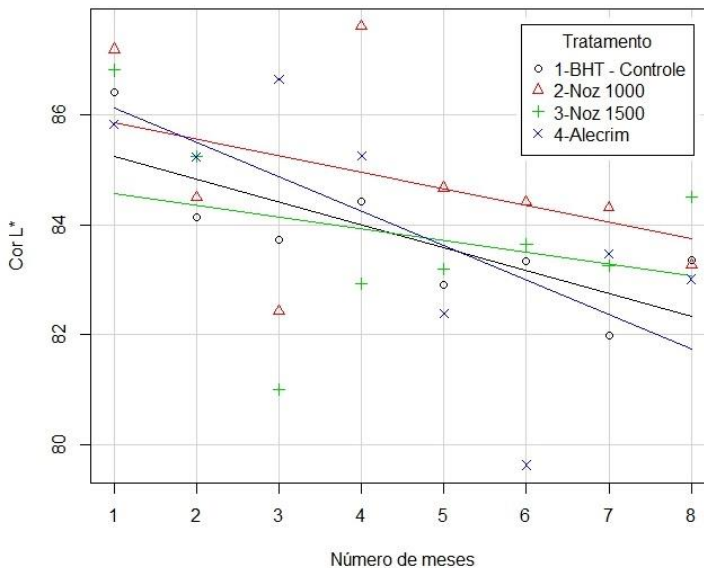
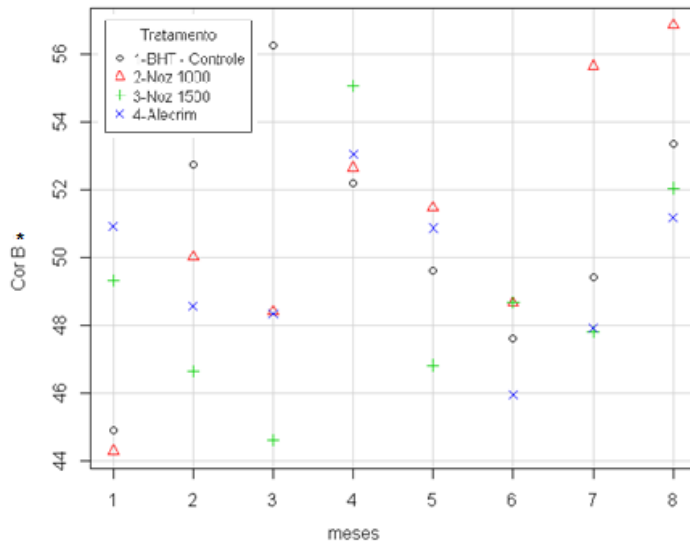
Os resultados relativos a cor mostraram que para o parâmetro de cor externa ( $a^*$ ) houve aumento significativo ao longo do tempo e a equação estimada para este parâmetro foi:  $\hat{y}_i = -0,880 + 0,112 t_i$ . A variação do parâmetro cor externa ( $b^*$ ) não foi significativa ao longo do tempo. Em relação ao índice externo ( $L^*$ ), a diminuição com o tempo é significativa, ou seja, a luminosidade diminuiu, tornando a parte externa mais escura com o passar do tempo. A equação estimada pode ser representada por  $\hat{y}_i = 85,827 - 0,387 t_i$ . Os baixos valores de  $R^2$  obtidos para cor  $a^*$  e  $L^*$  (0,32 e 0,26), mostram que apenas uma pequena parte da evolução deste parâmetro está relacionada com o tempo. Em todos os parâmetros de cor, não houve diferença significativa entre os

tratamentos, ou seja, a evolução do comportamento da cor foi igual para todos os antioxidantes utilizados.

Na Figura 6 podem ser observados os resultados relativos aos parâmetros externos de cor  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  das margarinas estudadas.

Figura 6 Evolução dos valores dos parâmetros de cor  $a^*$  (A),  $b^*$  (B),  $L^*$  (C) obtidos da parte externa das margarinas ao longo do tempo.

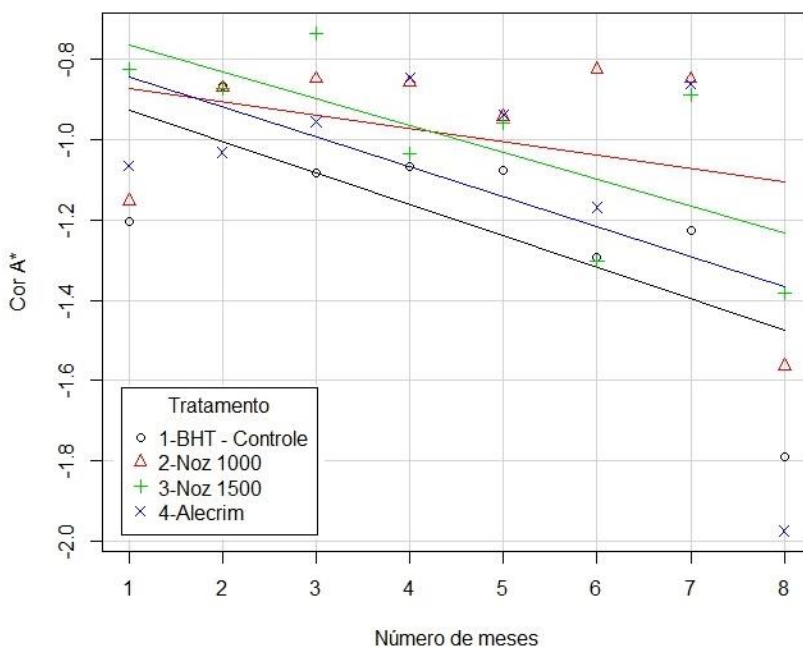


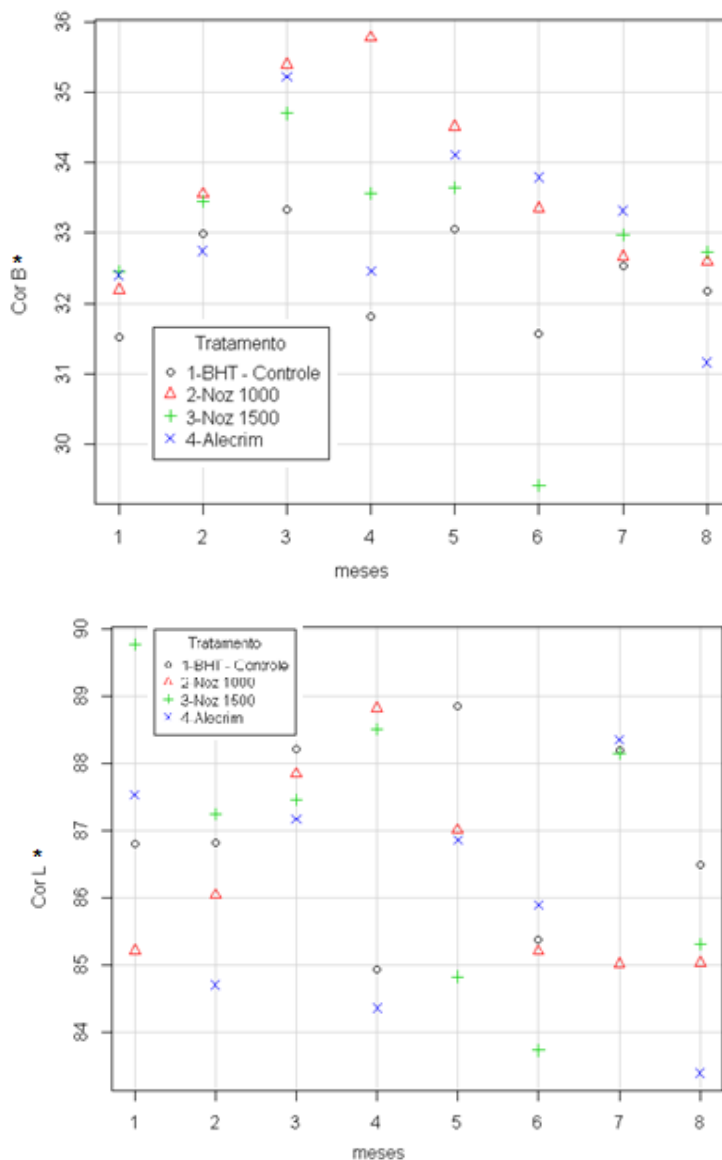


O parâmetro de cor interna  $a^*$  apresentou tendência em reduzir com o tempo. A equação estimada é representada por  $\hat{y}_i = -0,791 - 0,062 t_i$ . O baixo valor de  $R^2$  (0,26) significa que apenas 26% da cor é explicada em termos de redução ao longo do tempo. O parâmetro de cor

$b^*$  interna e  $L^*$  interna não apresentaram variação significativa ao longo do tempo. Em todos os parâmetros de cor, não houve diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, a evolução do comportamento da cor foi igual para todos os antioxidantes utilizados. Na figura 7, podem ser observados os resultados relativos ao parâmetro de cor interna  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  das margarinas estudadas.

Figura 7 Evolução dos valores dos parâmetros de cor interna  $a^*$  (A),  $b^*$  (B),  $L^*$  (C), obtidos da parte interna das margarinas, em função do tempo.





Ao longo do período de armazenamento, os parâmetros de cor externa  $a^*$  variaram entre -1,5 e 0,5 mostrando tendência ao aumento, ou seja, tendência a coloração vermelha. Os resultados de todos os



tratamentos variaram, em relação ao índice  $a^*$  interno de -0,8 a -2, ao longo do período de armazenamento, com tendência a reduzir, ou seja, tendência a coloração verde. Mas em geral, até o sétimo mês, os valores se mantiveram entre -0,8 e -1,3, com pequena alteração no último mês. No início do armazenamento, na parte interna das margarinas apresentou valores menores quando comparados aos valores da parte externa, ou seja, a parte externa já apresentava maior tendência ao vermelho. Ao final do período, enquanto na parte externa valores positivos foram determinados, na parte interna valores menores ainda foram encontrados.

Quanto aos valores de  $b^*$  externa, os resultados variaram entre 44 e 57, mas não foi observada uma tendência a cor amarela ou azul, ao longo do período estudado. Em relação aos valores de  $b^*$  interna, os resultados variaram de 31 a 36, mas não houve tendência a coloração azul ou amarela. Pode-se observar que, apesar de não existir variação significativa com o tempo, a faixa de valores encontrados entre a parte interna e a externa diferiu, sendo que na parte interna os valores foram menores. Sendo assim, a parte externa apresentou coloração amarela mais escura que na parte interna.

A luminosidade  $L^*$  da parte externa variou de 88 a 80, com valores mais concentrados entre 86 e 82. Na luminosidade da parte interna, os resultados variaram entre 85 a 90. Quando comparados os resultados da luminosidade interna e externa, pode-se perceber que na parte interna os resultados foram maiores, ou seja, a luminosidade das amostras era maior que na parte externa. Em margarinas o escurecimento da superfície ocorre quando a água evapora, deixando uma camada externa enriquecida de gordura que contém a matéria corante (CHRYSAN, 2005).

Óleos e gorduras frequentemente contêm pigmentos que absorvem ou transmitem a luz. A cor é um indicador inicial da qualidade, a maioria dos óleos possui cores específicas devido ao tipo e quantidade de pigmentos naturais presentes, por exemplo, a clorofila em óleo de soja. Óleos vegetais irão escurecer após um período de armazenagem ou a elevadas temperaturas devido a oxidação dos tocoferóis a tocoquinonas (WAN, 2000).

No estudo de Tananuwong e Tewaruth, (2010), maioneses enriquecidas com óleo de peixe foram adicionadas de extrato de arroz preto e armazenadas a 30°C durante 30 dias. A luminosidade e a cor amarela diminuíram, e a cor vermelha aumentou, indicando o escurecimento da amostra. A mudança ocorreu devido a reação de

Maillard e a degradação oxidativa das antocianinas a produtos indesejáveis de coloração marrom.

Análise de correlação foi realizada entre os diferentes índices analisados para um mesmo tratamento. Em todos os tratamentos, o índice de peróxido e o valor Totox estão correlacionados de forma significativa ( $p < 0,05$ ) e positivamente (noz-pecã 1000 e 1500 ppm,  $R > 0,98$  e alecrim e BHT,  $R > 0,95$ ). No caso da margarina adicionada de casca de noz-pecã 1000 ppm, a cor interna  $L^*$  se correlacionou positivamente com a cor interna  $b^*$  ( $R = 0,96$ ). Para a margarina adicionada de alecrim e de BHT, a cor externa  $L^*$  se correlacionou negativamente com a cor externa  $a^*$  ( $R = - 0,90$  e  $R = - 0,85$ ) de forma significativa ( $p < 0,05$ )

Após 8 meses de armazenamento foi determinado o perfil de ácidos graxos das margarinas estudadas e os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Perfil de ácidos graxos das margarinas estudadas após 8 meses de armazenamento.

Perfil de ácidos graxos %*	Margarina inicial	Noz-Pecã 1000 ppm	Noz-Pecã 1500 ppm	BHT 100 ppm	Alecrim 1000 ppm
C 16:0 – Ácido palmítico	15,08 ± 0,9A	13,91±0,46A	13,49±0,32A	13,77±0,55A	13,25±0,46A
C 18:0 – Ácido esteárico	10,15 ± 0,09B	13,68±0,03A	14,57±0,19A	14,90±0,16A	13,69±0,67A
C 18:1 9t – Ácido elaidico	9,68 ± 0,65A	10,89±0,36A	10,46±0,09A	11,08±0,15A	11,08±0,77A
C 18:1 – Ácido oleico	26,15 ± 0,25B	29,18±0,04A	27,99±0,40A	28,72±0,35A	28,87±0,60A
C 18:2 6t – Ácido linolelaídico	3,18 ± 0,06C	3,67±0,13B	3,46±0,01BC	3,66±0,21BC	4,41±0,04A
C 18:2 6c – Ácido linoleico	32,74 ± 0,52A	26,65±0,05BC	27,81±0,10B	25,69±0,51C	26,74±0,74BC
C 18:3 3 – Ácido linolênico	2,98 ± 0A	1,96±0,26B	2,17±0,08B	2,14±0,24B	1,91±0,26B
Total AG saturados	25,23	27,59	28,06	28,67	26,94
Total AG monoinsatura-dos	35,83	40,08	38,45	39,80	39,95
Total AG poli-insaturados	38,90	32,29	33,45	31,50	33,07

\* Média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa (Tukey test,  $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados obtidos os ácidos palmítico e elaídico não apresentaram diferença estatística significativa, o ácido linolênico (com 3 insaturações) apresentou redução significativa, e os ácidos esteárico (saturado) e oleico (1 insaturação) apresentaram aumento significativo, pois os ácidos graxos insaturados tendem a reduzir devido aos processos de oxidação, onde o oxigênio, luz ou calor, reagem com as duplas ligações até a saturação destas, levando consequentemente ao aumentos dos ácidos graxos mais saturados ou com menos insaturações (SCHAICH, 2005). O ácido graxo linolelaídico na margarina inicial apresentou o teor menor quando comparada as margarinas finais, sendo a margarina contendo alecrim significativamente a de maior teor. Em relação ao ácido linoleico, a margarina inicial apresentou significativamente o maior teor quando comparado aos tratamentos na etapa final, sendo o BHT o de menor índice, mas sem diferença significativa com noz 1000 ppm e alecrim, a margarina adicionada de noz 1500 ppm foi superior as outras indicando que sofreu menor conversão de ácido graxo poliinsaturado para saturado.

### **3.4 Análises Microbiológicas**

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas para coliformes a 45°C durante o período de armazenamento foram menores que 0,3 NMP/g para todas as amostras analisadas. Estes resultados estão de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001). Segundo Delamarre e Batt (1999) e Holliday e Beuchat (2003), fatores intrínsecos das margarinas, tais como: tamanho das gotículas da fase aquosa, adição de sal, pH, adição de conservantes, falta de nutrientes e boas práticas de fabricação limitam o crescimento da maioria dos micro-organismos, incluindo os patogênicos.

### **4 Conclusões**

Os extratos de casca de noz-pecã apresentaram elevado conteúdo de fenólicos totais, de taninos condensados e atividade antioxidante, nas análises *in vitro*. Para os índices estudados mensalmente nas margarinas, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os diferentes antioxidantes adicionados.

Portanto, conclui-se que o extrato de casca de noz-pecã pode ser uma alternativa natural ao antioxidante sintético BHT neste tipo de margarina e apresentar a mesma performance de proteção contra a oxidação. A importância disso se deve ao fato de que está sendo utilizado um resíduo de produção, além de não se fazer necessária a adição de substâncias sintéticas. Novas pesquisas se fazem necessárias, abrangendo diferentes tipos de margarinas e novas concentrações de extratos visando ampliar e confirmar estes resultados.

### **Agradecimentos**

À empresa Divinut Ind. de Nozes Ltda (Cachoeira do Sul – RS), pelo fornecimento da matéria prima. A empresa Bunge por disponibilizar a planta piloto para a produção das margarinas. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos da aluna Paula Cristina Engler Ribeiro. Aos alunos Rafael Luchtenberg, Vanessa Martins Hissanaga, Ana Cristina Pinheiro do Prado, Rossana Podestá e Bruna Mattioni, do Laboratório de Óleos e Gorduras (UFSC) pelo auxílio nas análises. A aluna Carlise Fritzen Freire pelo auxílio nas análises de cor. Este trabalho foi financiado pelo CNPq – Projeto número 479069/2011-5.

### **REFERÊNCIAS**

ABDALLA, A.E; ROOZEN, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, n.64, n.3, p. 323-329, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the AOAC**. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA, 2005.

AMERICAN OIL CHEMISYS SOCIETY – AOCS - **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. Washington, 2004.

ARAGÃO, G.M.F; CORRADINI, M.G; PELEG, M. A phenomenological model of the peroxide value's rise and fall during

lipid oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 12, p. 1143-1153, 2008.

AZIZKHANI, M; ZANDI, P. Effects of some natural antioxidants mixtures on margarine stability. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 49, p. 93-96, 2009.

AZIZKHANI, M; ZANDI, P. Effects of some natural antioxidante mixtures on margarine stability. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 47, n.3, p. 251-257, 2010.

AZIZKHANI, M; KAMKAR, A; NEJAD, A.S.M. Effects of tocopherols on oxidative stability of margarine. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 33, n. 1, p. 134-137, 2011.

BASIRON, Y. Palm oil. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

BEAL, B.H. **Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*)**, 2006, 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2006].

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, A.E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, pg. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 372, de 04 de setembro de 1997. *Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de margarinas*. Brasília: Diário Oficial da União, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, Diário Oficial da União, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, n. 49 de 22 de dezembro de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos Vegetais

Refinados; a Amostragem; os Procedimentos Complementares; e o Roteiro de Classificação de Óleos Vegetais Refinados. Brasília: Diário Uficial da União, 2006.

BUBONJA-SONJE, MARINA; GIACOMETTI, JASMINKA; ABRAM, MAJA. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and Rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1821–1827, 2011.

BUDINI, R.; TONELLI, D; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

CHEN, H.Y; LIN, Y.C; HSIEH, C.L. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1418 – 1424, 2007.

CHRYSAN, MICHAEL M. Margarines and Spreads. In: SHAHIDI, F. Bailey's **Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

CHU, Y-H; HSU, H-F. Effects of antioxidants on peanut oil stability. **Food Chemistry**, v. 66, p. 29-34, 1999.

DELAMARRE, S; BATT, A.C. The microbiology and historical safety of margarine. **Food Microbiology**, v. 16, p. 327-333, 1999.

ERKAN, N; AYRANCI, G; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinoc acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 76 – 82, 2008.

FILIP, V; HRADKOVA, I; SMIDRKAL, J. Antioxidants in margarine emulsions. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. S9-S11, 2009.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.-W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n. 5, p.1054-1059, 1994.

FRANKEL, E.N; HUANG, S.W; PRIOR, E; AESCHBACH, R. Evaluation of antioxidante activity of Rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. **Journal of the Science of food and agriculture**, v. 72, n. 2, p. 201-208, 1996.

GIBIS, M; WEISS, J. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 766-774, 2012.

GOKOGLU, NALAN; TOPUZ, OSMAN KADIR; BUYUKBENLI, HANIFE AYDAN; YERLIKAYA, PINAR. Inhibition of lipid oxidation in anchovy oil (*Engraulis encrasicolus*) enriched emulsions during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1398-1403, 2012.

GRAMZA-MICHALOWSKA, A; HES, MARZANNA; KORCZAK, J. Tea extracts antioxidative potencial in emulsified lipid systems. **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment**; v. 7, n.3, p. 29-34, 2008.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. A Rapid Preparation of Fatty Acids Methyl Esters from Lipids. **Lab. Pract**, v.22, p.457-477, 1973.

HOLLIDAY, S.L; ADLER, B.B; BEUCHAT, L. R. Viability of Salmonella, Escherichia coli O157:H7, and Listeria monocytogenes in butter, yellow fat spreads, and margarine as affected by temperature and physical abuse. **Food Microbiology**, v. 20, p. 159–168, 2003.

ISELL, T.A; ABBOTT, T.P; CARLSON, K.D. Oxidative stability index of vegetable oils in binary mixtures with meadowfoam oil. **Industrial Cro and Products**, v. 9, p. 115 – 123, 1999.

JEBE, T.A; MATLOCK, M.G; SLEETER, R.T. Collaborative study of the oil stability index analysis. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 11, p. 1055-1061, 1993.

JUSTO, O.R; MORAES, A.M; BARRETO, G.P.M; MERCADANTE, A.Z; ROSA, P.T.V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos

ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

KILCAST, D; SUBRAMANIAM, P. **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2000.

KIM, D.O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 3713–3717, 2002.

KIOKIAS, S; DIMAKOU, C; OREOPOULOU, V. Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1278–1284, 2009.

LA ROSA, L.A; ALVAREZ-PARRILA, E; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 1, p. 152-162, 2011.

LOPEZ-AGUILAR, J.R; VALERIO-ALFARO, G; MONROY-RIVERA, J.A; MEDINA-JUAREZ, L.A; O'MAHONY, M; ÂNGULO, O. Evaluation of a simple and sensitive sensory method for measuring rancidity in soybean oils. **Grasas y aceites**, v. 57, n.2, p. 149-154, 2006.

MARIUTTI, L.R.B; BARRETO, G.P.M; BRAGAGNOLO, N; MERCADANTE, A.Z. Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Extracts from Herbs and Spices Commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n.6, p. 1225-1232, 2008.

MATA, A.T; PROENCA, C; FERREIRA, A.R; SERRALHEIRO, M.L.M; NOGUEIRA, J.M.F; ARAUJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, p. 778 – 786, 2007.

MOURE, A; PAZOS, M; MEDINA, I; DOMINGUES, H; PARAJO, J. C. Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of almond shells acid hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 193–201, 2007.



MULLER, L.G; PASE, C.S; RECKZIEGEL, P; BARCELOS, R.C.S; BOUFLEUR, N; PRADO, A.C.P; FETT, R; BLOCK, J.M; PAVANATO, M.A; BAUERMANN, L.F; ROCHA, J.B.T; BURGER, M.E. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n.1-2, p. 165-171, 2013.

NOGALA-KALUCKA, M; GOGOLEWSKI, M. Sensorial and physico-chemical changes during storage of the margarine at diferente temperatures. **Nahrung**, v. 43, n. 1, p. 48-50, 1999.

NOGALA-KALUCKA, M; GOGOLEWSKI, M. Alteration of fatty acid composition, tocoferol contente and peroxide value in margarine during storage at various temperatures. **Nahrung**, v. 44, n. 6, p. 431-433, 2000.

OETTERER, M; REGITANO-D'ARCE, M.A.B; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 1. edição, Editora Manole Ltda, Barueri - SP, 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

POMERANZ, Y; MELOAN, C.E. **Food Analysis, Theory and Practice**. 3. edição. New York, Chapman & Hall, 1994.

PRADO, A.C.P; ARAGÃO, A.M, FETT, R; BLOCK, J.M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**; v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009a.

PRADO, A.C.P; ARAGÃO, A.M; FETT, R; BLOCK, J.M. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell infusion. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 4, p. 330-335, 2009b.

PRADO, A.C.P; ARAGAO, A.M; FETT, R; BLOCK, J.M. Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts. **Grasas y Aceites**, v. 60, fasc. 5, p. 458-467, 2009c.

PRADO, A.C.P; MANION, B.A; SEETHARAMAN, K; DESCHAMPS, F.C; ARELLANO, D.B; BLOCK, J.M. Relationship between antioxidante properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64–73, 2013.

PRADO, A.C.P. **Identificação e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (wangenh) C. Koch]**, 2013, 244 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrarias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [2013].

PRADO, A.C.P; SILVA, H.S; SILVEIRA, S.M; VIEIRA, C.R.W; MARASCHIN, M; FERREIRA, S.R.S; BLOCK, J.M. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. **Industrial Crops & Products**, n. 52C, p. 552-561, 2014.

PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1214-1218, 1978.

RAMALHO, V.C; JORGE, N. ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EM ÓLEOS, GORDURAS E ALIMENTOS GORDUROSOS. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMFUL, D; AUMJAUD, B; NEERGHEEN, V.S; SOOBRATTEE, M.A; GOOGOLYE, K; ARUOMA, O.I; BAHORUN, T. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1190-1196, 2011.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p.1231-1237, 1999.

RECKZIEGEL, P; BOUFLEUR, N; BARCELOS, R.C.S; BENVEGNI, D.M; PASE, C.S; MULLER, L.G; TEIXEIRA, A.M;

ZANELLA, R; PRADO, A.C.P; FETT, R; BLOCK, J.M; BURGER, M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1770–1778, 2011.

ROEDING-PENMAN, A; GORDON, M.H. Antioxidant properties of catechins and green tea extracts in model food emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4267-4270, 1997.

SAMOTYJA, URSZULA; MALECKA, M. Effects of blackcurrant seeds and Rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 317-323, 2007.

SILVA, F.A. M; BORGES, M.F.M; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p. 94-103, 1999.

SILVA, J.R. **Avaliação da estabilidade de margarina de mesa armazenada a temperatura de 30 °C**. 2009. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, [2009].

SCHAICH, K.M. Lipid oxidation: Theoretical aspects. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

SUN, YUE-E; WANG, WEI-DONG; CHEN, HONG-WEI; LI, CHAO. Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsion. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 453-466, 2011.

TANANUWONG, KANITHA; TEWARUTH, WANIDA. Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. **LWT – Food Science and Technology**, v. 47, p. 476-481, 2010.

VALENZUELA, A. B.; NIETO S. K. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. **Grasas y aceites**, v. 47, fasc. 3, p. 186-196, 1996.

VILLARREAL-LOZOYA, J.E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v.102, n. 4, p. 1241-1249, 2007.

WAN, P.J. Properties of fats and oils. In: O'BRIEN, RICHARD D; FARR, WALTER E; WAN, PETER J. **Introduction of fats and oils technology**. 2. Ed., Champaign, Illinois, AOCS Press, 2000.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In: SANTERRE, C. R; **Pecan technology**. New York: Chapman&Hall, p. 39-45, 1994.

YOSR, Z; HNIA, C; RIM, T; MOHAMED, B. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 412 – 419, 2013.